UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
Année 1960 - N° 473

RECHERCHES SUR LA SEPARATION ET LE DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE de l'Axérophtol (Vit. A) et du Calciférol (Vit. D)

THÈSE

pour le DOCTORAT de L'UNIVERSITÉ de LYON
Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant la
FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON
le 18 Février 1960

PAR

Jean LE TELLIER
Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Lauréat de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon
Né le 19 Février 1933, à SAINT-ETIENNE

F. ANDRÉ
5, Rue Bugeaud
LYON

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
Année 1960 - N° 473

RECHERCHES SUR LA SEPARATION ET LE DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE de l'Axérophtol (Vit. A) et du Calciférol (Vit. D)

THÈSE

pour le DOCTORAT de L'UNIVERSITÉ de LYON
Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant la
FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON
le 18 Février 1960

PAR

Jean LE TELLIER
Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Lauréat de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon
Né le 19 Février 1933, à SAINT-ETIENNE

F. ANDRÉ
5, Rue Bugeaud
LYON

698/16

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
& DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen honoraire

M.H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

M.M. LEVRAT : Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. NICOLAS, COLLET, GUIART, CADE, PATEL, LEPINE, TRILLAT,

MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY .

Professeurs

MM. HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique, radiologie, physiothérapie
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique & hygiène mentale
ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
SEDALLIAN	Clinique des maladies infectieuses et bactériologie
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale
DELORE	Hydrologie thérapeutique, climatologie & écologie sociale
PAUPART-RAVAULT	Clinique médicale
FROMENT	Clinique & prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale
GUILLEMINET	Clinique chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile
REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
POLLOSSON	Clinique gynécologique
PIGEAUD	Clinique obstétricale

BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
DUCLOS	Clinique stomatologique
BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie et Pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique oto-rhino-laryngologique
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique dermatologique et syphiligraphique
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSEL Jean	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
X	Histologie

Professeur à titre personnel

M. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine

Professeurs titulaires sans chaire

M. BANSSILLON	Obstétrique
ROMAN	Parasitologie
BERTOYE	Bactériologie
CIER J.François	Physiologie
CHATONNET	Physiologie
DORCHE	Pharmacie galénique et matière médicale

Maîtres de Conférences-Agrégés

PERROT Louis	Chimie organique et toxicologie
FEROLDI Jacques	Anatomie pathologique
CIER André	Pharmacie et pharmacologie
CREYSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
DUROUX Emile	Anatomie
BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis Prosper	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène

GARIN Jean Paul	Parasitologie	
MORET Robert	Physique	
ODDOUX Lucien	Botanique et cryptogamie	

AGREGES en EXERCICE

LECUIRE	Chargé d'enseignement	Neuro-chirurgie
GONIN André	d°	Cardiologie
MATHIEU Jacques		Obstétrique
MARION Joseph		Orthopédie
PONT Maurice	Chargé d'enseignement	Propédeutique médicale
VIGNON Georges	d°	Pathologie médicale
REVOL Louis	d°	Pathologie médicale
JAUBERT de BEAUJEU	d°	Pathologie chirurgicale
TRAEGER Jules	d°	Médecine générale
GUILLEMIN Georges	d°	Pathologie chirurgicale
PAPILLON Jean	d°	Electro-radiologie
BURTHIAULT René	d°	Obstétrique
FRANCOIS René	d°	Pédiatrie, Puériculture
GUINET Paul		Médecine générale
SAUTOT Jean		Pathologie chirurgicale
MARION Pierre		Chirurgie générale
MICHAUD Pierre		Chirurgie générale
MONNET Paul		Maladies infectieuses
GIGNOUX Marcel		O.R.L.
FREIDEL Charles		Stomatologie
PLAUCHU Marcel		Médecine générale
DEVIC Michel	Chargé d'enseignement	Pathologie médicale
COLIN Marcel	d°	Médecine légale
GUYOTAT Jean	d°	Neurologie
DUMONT Martial	d°	Obstétrique
DURAND Louis Noël	d°	Urologie
FRANCILLON Jacques	d°	Chirurgie générale
DESPIERRES Charles		Médecine générale
de MOURGUES Georges		Chirurgie générale
SAUBIER Eugène		Chirurgie générale
COLOMB Daniel		Dermatologie
TOLOT François		Médecine du travail
SCHOTT Bernard		Neurologie Psychiatrie
BONAMOUR Georges		Ophtalmologie

Examinateurs de la Thèse

MM : DREVON B.
BADINAND A.
PERROT L.
CIER A.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0043

A MA FEMME

Je dédie ce travail
en gage de bonheur.

A MES PARENTS

Qu'ils trouvent ici
toute l' expression
de ma gratitude pour
leurs efforts .

A MES BEAUX - PARENTS

A NOS FAMILLES

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur B. DREVON
Professeur de Pharmacie et de Pharmacologie
Agrégé du Val-de-Grâce
Pharmacien chimiste des Hopitaux militaires

Chevalier de la Légion d'Honneur

Il nous a inspiré ce travail et nous a guidé tout au long de son élaboration avec la plus grande bienveillance. Nous avons toujours trouvé auprès de lui les plus grandes facilités et les meilleurs conseils .

Il nous a fait de plus le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury .

Nous lui présentons l'expression de notre reconnaissance et l'assurons de notre respectueux dévouement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. BADINAND
Professeur de Chimie Analytique Pharmaceutique
Pharmacien des Hopitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous regrettons vivement de n'avoir jamais eu l'occasion de travailler sous sa direction dans les Hopitaux, où nous aurions profité avec joie de ses enseignements.

Il a accepté avec bienveillance de siéger parmi nos juges. Nous l'assurons de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé L. PERROT
Pharmacien des Hopitaux

Il a été notre Maitre dès le début de nos études à la Faculté et durant deux semestres d' internat dont nous gardons le meilleur souvenir .

Il nous a toujours accueilli avec la même bonté. Nous le prions d'accepter l'expression de notre profonde gratitude pour nous avoir fait l'honneur d'être parmi nos juges.

Monsieur le Professeur Agrégé A.CIER

Il nous a toujours encouragé dans notre travail et nous a grandement aidé tant par sa grande érudition que par son expérience.

Nous le remercions bien vivement d'être parmi nos juges et l'assurons de notre profond respect.

I N T R O D U C T I O N

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION - PLAN DU TRAVAIL

L'expert chargé du contrôle des préparations renfermant des vitamines liposolubles - principalement l'axérophtol (vitamine A) et le calciférol (vitamine D) - se heurte à des difficultés diverses qui tiennent essentiellement à la complexité des milieux dans lesquels on lui demande d'effectuer le dosage.

La présence d'excipients divers, de nature souvent mal précisée ou inconnue, celle de médicaments associés ou de "conservateurs", les variations dans les proportions relatives des deux vitamines, etc... sont parmi les raisons les plus courantes de l'échec de ses tentatives.

Aussi bien, entend-on encore souvent affirmer que seul le "dosage biologique" permet d'apporter à la fois la preuve de la présence de l'une ou l'autre des vitamines, ou des deux vitamines associées, et l'assurance qu'elles existent aux doses ou dans les proportions annoncées par le fabricant.

Il ne fait cependant aucun doute que les difficultés matérielles du "dosage biologique", sa longueur d'exécution et surtout ses incertitudes, écartent nécessairement la méthode biologique lorsqu'il s'agit de contrôle en cours de fabrication et même pour l'étude de la conservation des vitamines dans le médicament terminé.

L'application des "méthodes classiques" (entendant par là les procédés indiqués par la Pharmacopée elle même) pour le contrôle des vitamines pures, est le refuge habituel des rédacteurs de techniques destinées à la constitution du dossier demandé par le Ministère de la Santé en vue de l'obtention du visa. Cependant, il est de notoriété que, dès qu'une préparation présente une certaine complexité, les "méthodes classiques" sont à peu près sûrement inapplicables. L'expert, à la simple lecture du mode opératoire qui lui est communiqué (et imposé pour la vérification) peut souvent affirmer que ce mode

opératoire a été "rédigé" en s'inspirant des ouvrages classiques mais n'a pas donné lieu aux vérifications élémentaires qui - si elles avaient été faites - auraient montré son insuffisance notoire. Un fait frappant doit être signalé : l'absence de méthode officielle, suffisamment simple pour constituer une base de départ valable pour le contrôle de routine des préparations renfermant un mélange de vitamines, cas cependant fréquent dans la pratique.

Telles sont les constatations qui ont incité le Professeur DREVON à nous proposer le travail qu'on va lire.

Il eut été présomptueux, au simple énoncé du problème, et fort des résultats extrêmement encourageants obtenus au Laboratoire de Pharmacie chimique et Pharmacologie, où nous avons travaillé, dans la chromatographie quantitative de molécules complexes - les colorants par exemple - (21), voire de certains ions minéraux tels que le mercure (100), de vouloir se lancer directement dans l'étude des méthodes chromatographiques. Il fallait au préalable s'assurer de la validité des méthodes physiques (en l'occurence de la spectrométrie ultra violette ou de la colorimétrie), susceptibles d'être éventuellement appliquées à l'analyse des éluats chromatographiques. On sait que la spectrométrie ultra violette, méthode sensible, élégante et précise pour la vérification des vitamines pures, est inapplicable lorsque les deux vitamines se trouvent mélangées dans des proportions par trop différentes. Cette remarque à elle seule impliquait la nécessité d'une séparation préalable et c'est au problème de la séparation des vitamines que nous avons appliqué la chromatographie.

Mais, qu'il s'agisse du repérage des vitamines sur le support chromatographique, ou de leur dosage, l'emploi des réactions générales - de coloration par exemple, même si ces réactions ne sont pas spécifiques - n'était pas à exclure à priori. Nous verrons même que l'une des moins sensibles

d'entre elles (la réaction phosphomolybdique) nous a rendu les plus grands services.

Notre travail a donc obligatoirement commencé par un examen critique de l'ensemble des réactions utilisables et s'est poursuivi par l'étude systématique des facteurs dont l'expérience nous avait - en cours de route - démontré l'importance. Dans l'exposé que nous en faisons, nous avons été naturellement contraint d'adopter un ordre qui n'est pas superposable à celui que nous avons suivi expérimentalement. Le plan adopté correspond à la succession des chapitres, et peut se résumer comme suit :

INTRODUCTION

I - POSITION DU PROBLEME - Enquête statistique sur les préparations polyvitaminées.
Position et limitation du problème.

II - RAPPEL DES PROPRIETES DES VITAMINES A et D
Structure.
Propriétés physiques - Solubilités-Spectres ultra violet.
Réactions colorées communes et différentielles.
Etude partielle de la réaction de CARR et PRICE.

III - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES VITAMINES A et D
a) chromatographie sur colonne.
Alumine, Floridine.
b) chromatographie de partage.
technique ascendante ou descendante.

TRAVAIL PERSONNEL

- Introduction
- Produits utilisés
  - Vitamines
  - Adsorbants
  - Solvants
  - Réactifs divers
  - Matériel

Chapitre IV

- Analyse spectrophotométrique des mélanges de vitamines A et D en solution.

Chapitre V

- Chromatographie sur papier paraffiné.

Chapitre VI

- Chromatographie sur papier aluminé.
  - Préparation du papier
  - Préparation des échantillons
  - Révélation
  - Stabilité des solutions diluées d'axérophtol
  - Elution de la vitamine A et dosage
  - Elution de la vitamine D

Chapitre VII

- Chromatographie sur papier au stéaro-chlorure de chrome.
  - Préparation du papier
  - Systèmes de solvants
  - Révélation
  - Elution
  - Dosage des vitamines A et D.

Résumé et Conclusion

Poursuivi depuis un an, ce travail a été interrompu par l'appel de notre classe sous les drapeaux; il est loin d'être terminé et loin d'apporter une solution complète au problème proposé. Il résout cependant - croyons nous - le problème de la séparation et du dosage de 10 à 50 microgrammes de vitamines mélangées, avec une approximation de $\pm$ 5 p. 100, par des moyens qui sont à la portée de tous les Laboratoires de contrôle.

Chapitre I

Enquête statistique sur les préparations polyvitaminées. - Position et limitation du problème

Le fichier des spécialités constitué depuis 1950 au Laboratoire de Pharmacie chimique et Pharmacologie, nous a permis de faire rapidement une enquête sur 226 préparations polyvitaminées de tous pays, et renfermant des vitamines A et D, seules ou en mélanges :

40 préparations, soit 18% ne contiennent que de la vitamine A
27 préparations, soit 12% ne contiennent que de la vitamine D
159 préparations, soit 70% contiennent les deux.

Les concentrations relatives des deux vitamines sont essentiellement variables;

Les formes galéniques rencontrées sont les suivantes :

Capsules (surtout aux U.S.A.)	61 préparations	soit 27 %
Ampoules	17 préparations	soit 7,5 %
Dragées, comprimés, pilules	38 préparations	soit 17 %
Tablettes	13 préparations	soit 5 %
Pommades ou crèmes	10 préparations	soit 4,5 %
Suppositoires	8 préparations	soit 3,5 %
Emulsions ou suspensions aq.	9 préparations	soit 4,5 %

La nature des excipients n'est pas toujours exactement indiquée dans les répertoires consultés; L'excipient est cependant important à considérer pour les raisons déjà dites, les excipients gras étant ceux qui à priori risquent de provoquer la plus grande gêne à l'analyste, ces excipients se trouvant dissous, en proportions importantes ou même totalement, en même temps que les vitamines par les solvants utilisés . L'existence d'un coefficient de partage de la vitamine entre l'excipient et le solvant est aussi à envisager.

Si maintenant nous voulons considerer les substances actives accompagnant les vitamines liposolubles nous pouvons dresser le tableau suivant .

Vitamine B1	144 préparations soit 63 %
Vitamine B2	134 préparations soit 59 %
Vitamine C	131 préparations soit 58 %
Nicotinamide	122 préparations soit 54 %
Vitamine B6	96 préparations soit 40 %
Ac. Panthotenique	92 préparations soit 39 %
Vitamine B12	79 préparations soit 33 %
Vitamine E	55 préparations soit 23 %
Acide folique	42 préparations soit 18 %
Oligo éléments divers	35 préparations soit 15 %

Ces oligo éléments sont très variables en quantité et en qualité.

A l'exception des tocophérols utilisés comme conservateurs, sans but thérapeutique avoué, la plupart des médicaments associés sont hydrosolubles et un épuisement par un solvant convenable devrait permettre de les éliminer avec assez de facilité.

Quelques types de formules reviennent fréquemment et le comportement chromatographique des constituants devra être étudié avec soin. Tel est le cas des mélanges avec choline, inositol, méthionine (16 fois) ou de ceux comportant des stéroïdes tels que : hydrocortisone, testostérone, (10 fois) dont l'analyse est a priori plus difficile.

Afin d'être complet, nous signalerons la fréquence des ions minéraux (Ca et P) et des amino-acides dont la présence n'est pas a priori une gêne insurmontable pour l'expert.

Le tableau général suivant donne d'ailleurs les compositions et les formes de ces 226 spécialités étudiées.

TABLEAU (voir pages suivantes)

Légende

1 - Vitamine A
2 - Vitamine D
3 - Vitamine E
4 - Vitamine B1
5 - Vitamine B2
6 - Vitamine B6
7 - Vitamine B12
8 - Nicotinamide (vit.PP)
9 - Vitamine C
10 - Panthenol. (vit. B5)
11 - Vitamine P
12 - Acide Folique
13 - Oligo-Elements.

1ère Colonne verticale, à gauche, N° de référence des préparations.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		Forme
1	+		+	+	+									Reserpine.Théophylline. Levure	Caps.
2	+	+												-	Amp.
3	+	+	+	+	+	+		+	+	+				-	Amp.
4	+	+		+	+			+	+					Hydrate de C. Ca. P. K	Tabl.
5	+	+	+											Antipiol.Arnica.Camomille	Pom.
6	+		+											Huile de germe de blé	Emul.
7	+	+				+	+		+					Hesperidine.Os en poudre	Drag.
8	+			+						+				Privine. Digitale	Sol.
9	+													Hydrocortisone.Neomycine	Sol.
10	+		+	+	+	+	+	+		+		+		Choline.Inositol.Cysteine	Caps.
11	+		+							+				Prednisone.Androstenediol	Caps.
12	+							+						Naphtazoline. Cysteine	Sol.
13	+	+	+	+	+	+		+	+		+			Choline.Inositol	Sol.
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		-	Caps.
15	+	+	+	+	+	+		+	+	+				-	Gtt.
16	+		+											Allicine	Cap.
17	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+	Glycerophosphate Ca.	Comp.
18	+			+	+				+	+			+	-	Coll.
19	+		+	+		+	+		+		+	+	+	Inositol.Choline.Levure	Caps.
20	+	+	+	+	+	+		+	+	+				Methionine.Polyethylene Glycol	Sp.
21	+	+												-	Sol.
22	+	+												-	Gtt
23	+	+												-	Gtt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	12	13		Forme
24	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		Méthionine.Polyethylène Glycol	Pom.
25bis	+	+												Icthyol.Baume du Pérou	Pom.
26	+	+												-	Gtt.
27	+	+												-	Amp.
28	+	+	+	+	+	+		+	+	+				-	Supp.
29	+	+	+	+	+			+	+	+				-	Caps.
30	+			+										Ephédrine. Lait (pdre)	Comp.
31	+	+	+	+	+	+		+	+	+					Caps.
32	+	+	+												Drag.
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+			Caps.
34	+	+		+	+	+	+	+	+	+					Caps.
35	+									+					Pom.
36	+	+		+	+	+	+	+		+				Gluconate.Glycerophosphate Ca.	Sp.
37	+														Sol.
38	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		Lysine	Tabl.
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ac. orotique.glutamique	Comp.
40	+													Testosterone.diethylaminothéophylline	Comp.
41	+		+												Drag.
42	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+			Drag.
43	+													Huile végétale	Caps.
44	+	+	+	+	+	+		+	+	+				Ac. gentisique	Amp.
45	+													Streptomycine.Kaolin	Comp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		Forme
46	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Choline. Inositol	Tabl.
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		Choline. Inositol. Methionine	Tabl.
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	Facteur intrinsèque	Caps.
49	+	+		+	+	+	+	+	+			+		Menadione. Ca.	Tabl.
50	+	+		+	+	+	+	+	+				+	Ca. P.	Caps.
51	+	+		+	+	+	+	+	+	+					Caps.
52	+	+	+	+	+	+	+	+					+	Testosterone.Oestradiol	Caps.
53	+	+													Caps.
54	+	+		+	+	+	+	+		+			+	Phosphate de Ca.	Pom.
55	+	+		+	+	+	+	+	+				+	-	
56	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+	Gluconate de Ca	Caps.
57	+	+	+	+	+			+	+					Lactose.Saccharose.Ac.stéarique	Drag.
58	+	+		+	+		+	+	+				+	-	Drag.
59	+	+												-	Amp.
60	+	+		+	+	+	+	+		+		+		Lysine. Gluconate Ca.	Pdre.
61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	Facteur intrinsèque. Menadione	Caps.
62	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	-	Caps.
63	+	+		+	+	+	+			+				Lecithine de soja	Caps.
64	+	+		+	+	+	+	+	+			+		Ca. P	Caps.
65	+													Essences diverses	Gtt.
66	+													-	Amp.
67	+													Huile de Sesame	Pom.
68	+	+		+	+									-	Caps.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
69	+	+		+	+	+	+	+	+	+				Huile de Sesame	Caps.
70	+	+		+	+	+	+	+	+	+				Gluconate de Fe	Caps.
71	+	+		+	+			+	+	+		+	+	Choline.Rutine.Moelle d'os	Caps.
72	+	+		+	+		+	+	+					Dextrose	Pdr.
73	+	+		+	+		+	+	+			+	+	-	Comp.
74	+													Sulfaguanidine. Amylène.Vaseline	Pom.
75	+	+		+	+	+	+	+	+					Urée .Methyl et Propylparaben	Sol.
76	+	+	+	+	+	+	+	+	+					Vit.K. Choline.Rutine.Foie	Caps.
77	+	+		+				+	+				+	Ac. aminés. Chlorophylle	Caps.
78	+	+		+	+	+		+	+				+	-	Drag.
79	+			+	+		+	+	+	+		+		Foie. Ext. d'estomac. Os (pdr)	-
80	+	+		+	+			+	+					-	Sol.
81	+	+	+	+	+	+		+	+					-	
82	+	+				+	+	+	+	+		+	+	-	Caps.
83	+	+		+	+		+	+	+				+	Foie. Gluconate	Drag.
84	+	+		⊛	+	+			+					-	Caps.
85	+	+	+	+	+	+								Rutine. Choline. Inositol	-
86	+		+											Oestradiol. Progesterone. Testosterone	Amp.
87	+	+		+	+									Os (pdre). Ext. de Cascara	Drag.
88	+	+		+	+		+	+	+	+		+		-	Caps.
89	+													-	Caps.
90	+	+		+	+	+		+	+					-	Drag.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
91	+	+		+	+	+	+	+				+	+	Gluconate Fer	Caps.
92	+	+		+	+	+	+							Huile de foie desaminée	Sup.
93	+	+	+	+	+	+		+	+	+				-	Gtt.
94	+	+		+	+	+	+		+					-	Amp.
95	+	+												Creosote.Eucalyptol.Penicilline	Supp.
96	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		Amphetamine.Ca.Fer.Iode	Tabl.
97	+	+	+						+					-	Gtt
98	+	+												-	Gtt.
99	+	+		+	+			+	+					Amphetamine. Barbituriques	Caps.
100	+													-	Caps.
101	+													-	Amp.
102	+	+												-	Amp.
103	+	+							+					Levulinate de Ca	Supp.
104	+	+												-	Supp.
105	+		+									+		Chiline. Methionine.Inositol Dihydro-	-
106	+	+												xypropyltheophylline.Sorbitan Sulfathiazol.Lanoline.Vaseline	Pom.
107	+	+		+	+	+	+		+				+	Amphetamine	Caps.
108	+	+							+					-	Sol.
109	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		Ca. P.	Caps.
110	+													Tyrothricine	Pom.
111	+	+		+	+			+						Amphetamine	Caps.
112	+													-	Caps.
113	+													-	Comp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
114	+	+		+	+	+	+	+	+					N-phenyl-N-benzyl dimethylaminopropanol	Drag.
115	+	+		+	+			+		+				Fer. Os (pdre.)	Pom.
116	+	+												Levure	Supp.
117	+	+		+	+				+				7	Huile de foie de morue	Caps.
118	+	+												Ca	Comp.
119	+													Methionine.Inositol.Papaverine	Pom.
120	+	+		+	+			+	+	+				Fer. Moelle d'os	Comp.
121	+	+		+	+			+	+						Sol.
122	+	+		+	+			+	+					Fer. Moelle d'os	Caps.
123	+	+		+	+	+	+		+	+					Comp.
124	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		Lachate de Ca	Tabl.
125	+	+		+	+		+	+	+			+		-	Tabl.
126	+	+		+	+									-	amp.
127	+	+	+	+	+	+		+	+	+				-	Supp.
128	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	Amphetamine.Phenobarbital	-
129	+	+		+	+	+			+					Ephedrine	Tabl.
130	+	+		+	+	+	+	+	+	+				-	-
131	+	+	+	+	+	+	+						+	-	-
132	+	+		+	+	+		+	+					Fer. Vit. K	Caps.
133	+	+		+	+			+	+					INH	Caps.
134	+			+	+	+		+	+					Propylthiouracile	Comp.
135	+	+												Butylaminobenzoyl dimethylaminoethanol. Sulfate basique de Bi	Pom.
136	+	+		+	+									Caseine.Hydrates de C	Pdre.
137	+	+												Formiate Ca	Supp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
138	+	+		+	+				+					Formiate Ca.	Lait
139	+	+	+	+	+	+	+	+				+		Choline. Inositol	Sol.
140	+	+	+	+	+	+		+	+	+				Choline. Inositol	Caps.
141	+	+	+	+	+	+		+	+	+				- -	-
142	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		- -	-
143	+													- -	Caps.
144	+	+		+	+	+	+	+	+	+				- -	Gtt.
145	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+	Fer. Ca. P.	Tabl.
146	+													-	-
147	+	+					+		+					-	-
148	+	+		+	+	+	+	+	+			+		Androstène-diol. Ca.P. Mg	-
149	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	Fe. Ca. P.	-
150	+	+	+										+	-	-
151	+	+		+	+			+	+						Gtt.
152	+	+		+	+	+	+	+	+			+		Vit.K. Rutine. Ca.Fer	Caps.
153	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				MgO	Comp.
154	+		+	+	+	+	+	+						-	Amp.
155	+	+												Gluconate Ca	Comp.
156	+	+		+	+	+	+	+	+	+				-	-
157	+	+							+					-	Sol.
158	+	+		+	+			+	+					Foie. Fer. Ca	Comp.
159	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		Ethynil-oestradiol	-
160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				" " methyltestosterone	-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
161	+	+	+	+	+	+	+	+	+					Ethynyl-oestradiol,methyltestosterone	Comp.
162	+	+		+	+	+	+	+	+					Amphetamine	-
163	+	+		+	+		+	+	+					-	Caps.
164	+													Camphre. Gaicol	Amp.
165	+	+							+					-	Sol.
166	+	+		+	+			+	+					-	-
167	+	+												Lactate Ca. Cire blanche	Supp.
168	+	+		+	+	+		+	+					Amphétamine	Troc.
169	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				-	Caps.
170	+	+		+				+	+	+			+	Amphetamine. Ca.Fer	Caps.
171	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	Choline.Inositol. Rutine	Caps.
172	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	-	Pill.
173	+													-	Caps.
174	+	+		+	+	+		+	+					Amphetamine	-
175	+	+		+	+			+	+					Amphetamine.Carboxymethylcellulose	Caps.
176	+	+		+	+			+	+	+				-	Caps.
177	+	+	+	+	+			+	+					-	Sol.
178	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				-	Gtt.
179	+	+							+					-	Gtt.
180	+	+							+					-	Gtt.
181	+	+	+	+	+	+		+	+	+				-	Caps.
182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				-	-
183	+	+		+	+			+	+			+		Ca. P. Fer	-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
184	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	Choline.Inositol.Rutine.	Caps.
185	+	+		+				+		+		+	+	Amphetamine. Ca.Fer	-
186	+													-	-
187	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		-	-
188	+		+	+	+			+	+					Choline. Rutine	-
189	+	+												P. Ca.	Comp.
190	+	+							+					-	Gtt.
191	+	+		+	+	+	+	+		+				-	Gtt.
192	+			+	+	+		+	+	+				Choline. Inositol.Rutine.	Caps.
193	+	+		+	+		+	+	+					-	Comp.
194	+	+		+	+			+					+	Extrait de malt	Pate
195	+	+		+	+			+	+					-	Sol.
196	+	+		+	+	+	+	+	+						Caps.
197	+	+		+	+				+	+					Pil.
198	+	+		+	+									Amphetamine. Fer. Mg. Ca	Caps.
199	+	+		+	+		+	+	+					P. Ca. Fer	Caps.
200		+											+	Parathyroide.Testicules(pd)Gluconate	Comp.
201		+												Maxillaire. Dent(pdr) Ca. Mg	Gran.
202		+												Thyroïde.Parathyroïde(pd)Gluconate	Comp.
203		+													Sol.
204		+												Aspirine. Phosphate Ca	Comp.
205		+												Phosphate. Gluconate Ca	Comp.
206		+		+	+	+	+							Levure deBière	Tabl.
207		+		+										Phosphate Ca	-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
208		+												Fer. Os (pdre)	Tabl.
209		+		+	+	+		+						Choline. Phosphate et citrate Ca	Sol.
210		+												-	Gtt
211		+							+					Methylarsinate.Glycerophosphate.Nucl.	Gran.
212		+		+					+					Inositol.Glutathion.Hemoglobine	Gran.
213		+												Inositol. Gluconate Ca	Amp.
214		+												-	-
215		+				+			+				+	Glycerophosphate.Gluconate Ca	Tabl.
216		+							+					Phosphate Ca	Drag.
217		+						+	+					Gluconate.Alc.de citron.Ac.Hypophos.	Amp.
218		+												-	Sp.
219		+												Gluconate.Hypophosphite	Gran.
220		+		+	+	+		+						Glycerophosphaté Ca.Mg.Mn	-
221		+		+										Foie. Malates Fer et Cu	Comp.
222		+													Amp.
223		+													Sol.
224		+							+					Gluconate Ca	Amp.
225		+													Amp.
226		+		+		+		+						Phosphate Ca. Fer	Drag.

Chapitre II

Rappel des propriétés des vitamines A et D

AXEROPHTOL (vitamine A)

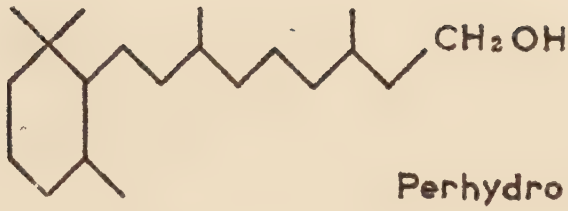
En réalité, il faudrait distinguer une vitamine A_1 et une vitamine A_2 (voir formules) différant par une double liaison. Cependant la très faible importance quantitative de la seconde nous permettra de n'envisager que l'Axérophtol.

La vitamine A est une huile jaune clair, soluble dans les graisses et les solvants organiques, insoluble dans l'eau. C'est une substance très fragile, éminemment oxydable, en particulier en présence de l'oxygène atmosphérique. En atmosphère inerte elle est par contre relativement stable à la chaleur, surtout en milieu alcalin.

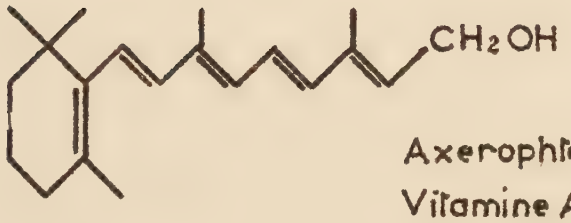
Sa formule met en évidence :

- une fonction alcool, d'où l'existence d'esters très répandus à l'état naturel, tels que le palmitate et l'acétate. L'existence de la fonction alcool explique en outre l'apparition dans certains cas de l'aldéhyde correspondant : axérophtal ou rétinène ou, mieux, rétinal.
- de nombreuses doubles liaisons conjuguées (5) entrainant : son instabilité, certaines de ces réactions colorées, et l'existence d'une perhydro vitamine A, entièrement saturée (voir formule).

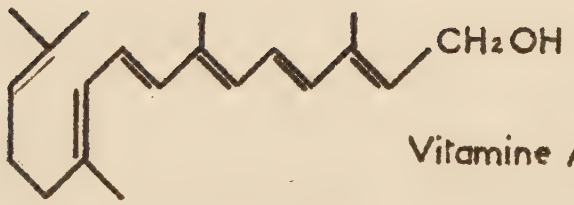
Biologiquement, la vitamine A dérive de pro-vitamines, parmi lesquelles figure classiquement le Béta carotène. Il n'est donc pas étonnant de voir souvent l'Axérophtol accompagné de "caroténoïdes" corps d'une série chimique dont les particularités nous seront souvent une grande gêne.



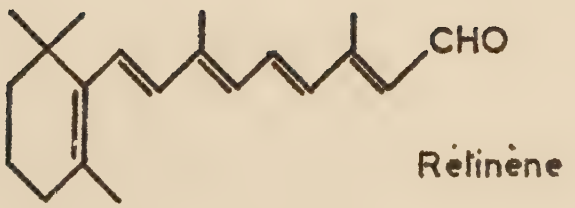
Perhydro_Vitamine A



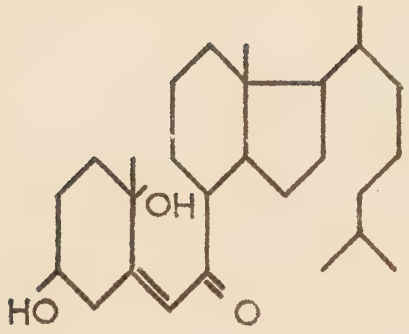
Axerophtol
Vitamine A



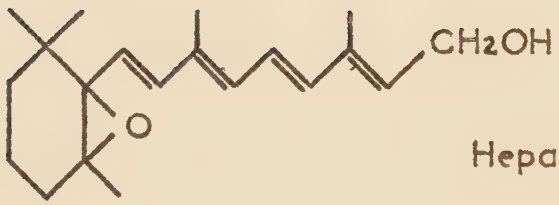
Vitamine A2



Rétinène



Cetone 250



Hepaxanthène

β carotène

Pour la compréhension plus complète de la littérature ajoutons que :

- l'éther bis-axerophtylique provient de la condensation de deux molécules d'axérophtol avec élimination d'une molécule d'eau,
- le kitol serait une forme dimoléculaire inactive libérant l'axérophtol par chauffage,
- la néo-vitamine A se différencierait de la vitamine A par la position cis du carbone porteur de la fonction alcool.

La vitamine A est le plus souvent dosée en unités internationales celles-ci correspondant à 0,3 µg d'axérophtol pur. (*)

Propriétés optiques

La vitamine A alcool présente un maximum d'absorption dans l' U.V. à 328 mµ, l'absorption spécifique : $E^{1\,\%}_{1\,cm}$, qui est la densité optique d'une solution à 1 % examinée sous 1cm d'épaisseur, est de l'ordre de 1750. Les esters présentent un maximum d'absorption très proche dont l'intensité est pratiquement la même.

L'habitude s'étant imposée d'exprimer le titre en Unités Internationales (U.I.) on a déterminé empiriquement des coefficients permettant d'exprimer directement l' "activité biologique", connaissant l'absorption spécifique. Mais ces coefficients sont en partie arbitraires et dépendent du solvant utilisé; d'où des divergences entre les auteurs. PRADHAN (88) donne la valeur de 1920 dans le cyclohexane et de 1880 dans l'éthanol, BAGNALL (2) utilise les coefficients suivants :

(*) Notons que l'activité vitaminique des substances naturelles peut parfois être rapportée, partiellement, à d'autres molécules telles que l'hépaxanthine pour la vitamine A(49) (27) ou la cétone 250 pour la vitamine D (90).

1920 pour les esters de vitamine A dans le cyclohexane,
1910 pour la vitamine A alcool dans le cyclohexane,
1895 pour les esters dans l'isopropanol,
1880 pour l'alcool dans l'isopropanol.

Il est inutile de multiplier les citations. Disons que l'accord est maintenant pratiquement établi sur une valeur moyenne de 1900. Mais pour que le résultat soit valable il faut : d'une part que la richesse en axérophtol soit suffisament importante et d'autre part que le spectre ne soit pas trop déformé par des produits d'altération de la vitamine.

Si l'on n'obtient pas le spectre caractéristique on peut recourir à des méthodes de correction graphique imaginées séparément par VACHER et Collaborateurs (115) et par MORTON et STUBBS (72). Le principe de ces corrections est le suivant:

On choisit deux longueurs d'onde particulières encadrant la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. Si le spectre est celui de l'axérophtol, la corde tracée est horizontale. Mais si des substances parasites perturbent le spectre,cette corde est oblique et de l'angle formé par cette corde avec l'horizontale on tire une correction géométrique. En général les longueurs d'onde choisies sont telles que les absorptions correspondantes soient égales à 6/7 de l'absorption maximum (119) (3). Ces valeurs peuvent être désignées par E_p à 313 mμ, E_m à 328 mμ et E_g à 338 mμ . L'absorption spécifique maximum corrigé est donnée par la formule suivante :

$$E \text{ max. corrigé} = 7 (E_m - E_g) - 2{,}9 (E_p - E_g).$$

Des nomogrammes permettant l'application simplifiée de cette formule ont été établis par PANCRAZIO (85) et par ROGERS (93).

Dans le même ordre d'idées,VACHER (115) a donné une méthode permettant une étude plus poussée du spectre de la vitamine A. Cette méthode permet de connaitre les

substances interférantes : nous en avons fait usage dans ce travail, aussi en parlerons nous plus loin avec quelque détail.

Après avoir tracé le spectre de l'échantillon on trace les cordes correspondant aux intervalles suivants :

Intervalle A 321,3 mμ - 333,6 mμ
Intervalle B 312,9 mμ - 333,6 mμ
Intervalle C 306,1 mμ - 345,0 mμ

Si l'échantillon est pur, ces trois cordes sont parallèles. Si elles ne le sont pas, l'étude des directions respectives de ces droites indique la nature des substances perturbatrices. VACHER donne en outre des formules de correction permettant d'évaluer la vitamine A réellement présente.

La difficulté d'interprétation de certains résultats a conduit à rechercher d'autres procédés spectrométriques. De nombreux auteurs ont signalé la transformation possible de la vitamine A en perhydro vitamine A par saturation des doubles liaisons, sous l'action de traces d'acides minéraux (23), (67), (104). Le spectre est alors modifié et prend une structure fine particulière. Ces transformations ont été utilisées pour confirmer la présence de l'axérophtol dans certains produits biologiques (1), (39). Le catalyseur utilisé peut être l'acide chlorhydrique en solution éthanolique (71), l'acide chlorhydrique en solution chloroformique (86), ou mieux l'acide para-toluène sulfonéque en solution benzénique comme le signale BUDOWSKY (7).

Cet auteur recommande de déterminer le "spectre différentiel" et de calculer l'augmentation de la densité optique, due à la déshydratation, à 399 mμ. Un coefficient permet d'exprimer le résultat en vitamine A. Cette méthode semble satisfaisante, la sensibilité est augmentée de même que la spécificité puisque les caroténoïdes ne modifient pas le tracé. On peut appliquer le procédé même sur des extraits très impurs.

Réactions colorées de la vitamine A.

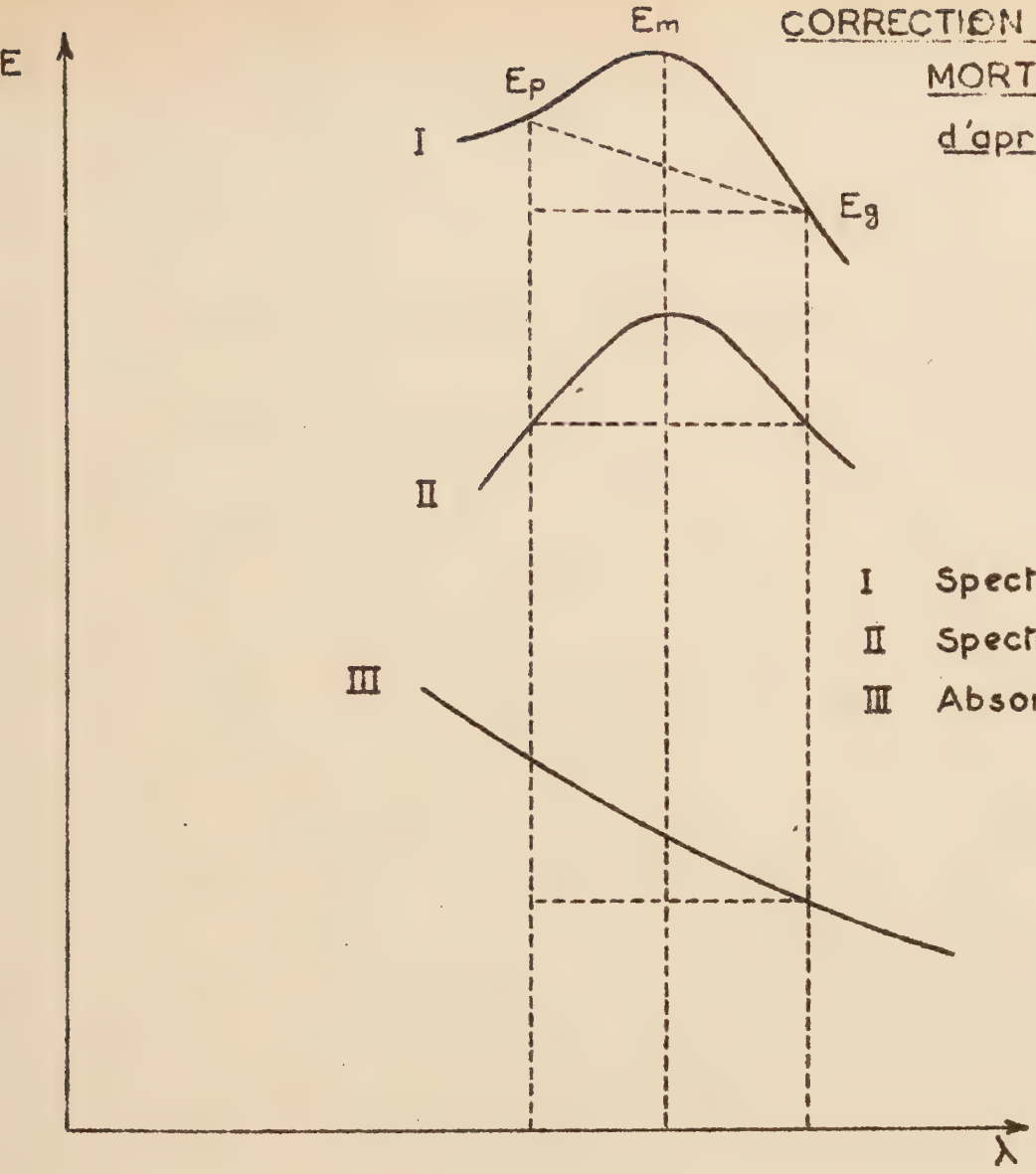
Le nombre de réactions colorées décrites pour l'axérophtol est élevé; Cependant aucune n'est absolument spécifique et quelques unes seulement peuvent s'appliquer à un dosage.

Les acides furent les premiers réactifs employés :

- coloration rouge avec l'acide sulfurique concentré,
- réaction de FEARON avec l'acide trichloracétique (proposée en 1925),
- réaction avec l'acide perchlorique. La réaction, stabilisée par l'acétate d'amyle, sert au dosage différentiel du carotène et de la vitamine A en mélange par lecture de l'absorption à 525 et 725 mμ : méthode de FLESCH (35),
- coloration bleue avec un mélange acide phosphotungstique-anhydride acétique, appliquée de même au dosage par JAKOLEVIC (46).

Ce sont surtout les chlorures métalliques qui sont utilisés pour la caractérisation de la vitamine A :

- test de ROSENHEIN au trichlorure d'arsenic,
- réaction de CARR et PRICE au trichlorure d'antimoine dont l'importance justifie un paragraphe particulier,
- Réaction de SABOV (99) au trichlorure de bismuth dont la conservation serait meilleure que celle du réactif précédent,
- réaction de ROSENTHAL (95) au trichlorure d'antimoine additionné de pyrocatéchine. Après chauffage à + 60° C apparait une coloration rouge-violet stable qui n'est pas donnée par le carotène,
- réaction de CAVINA (11) au trichlorure d'antimoine en solution diluée,
- enfin diverses chlorhydrines doivent aussi retenir l'attention.



CORRECTION DE :

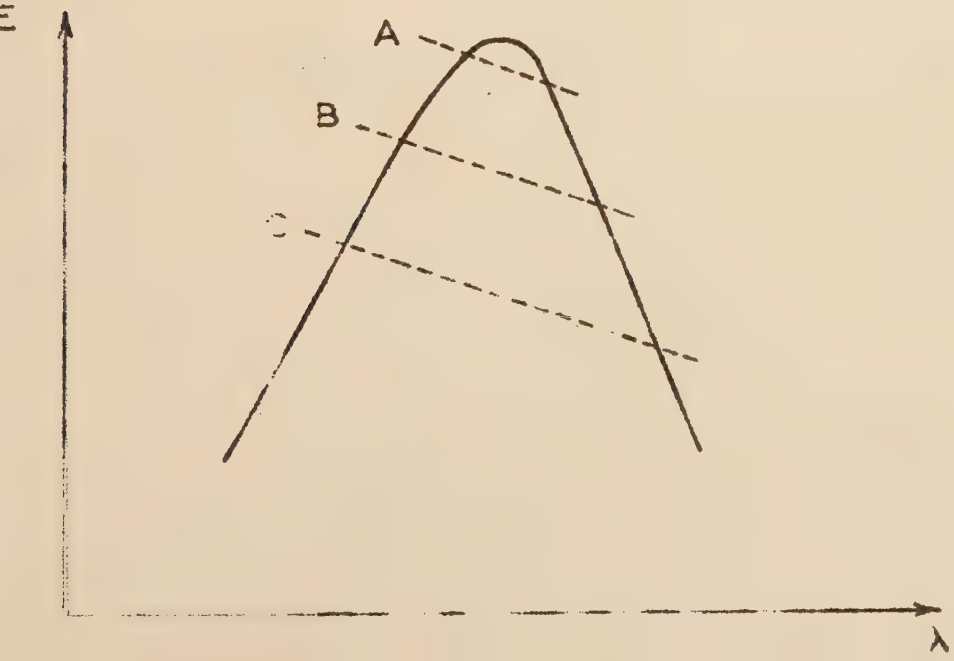
MORTON ET STUBB'S

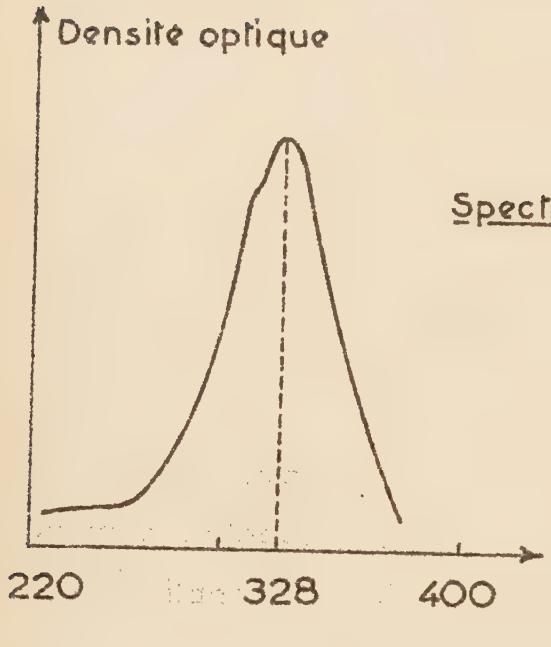
d'apres Raoul

I Spectre determiné

II Spectre corrigé

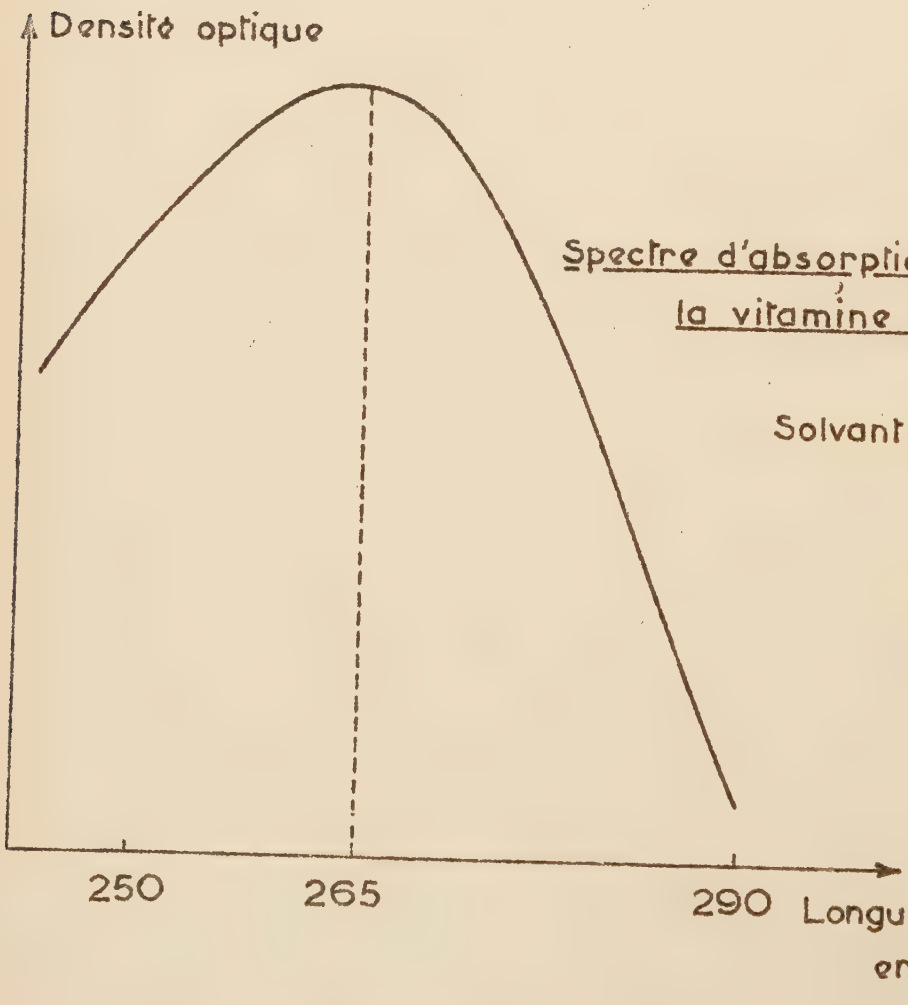
III Absorption de base





Spectre d'absorption de la vitamine A

Solvant : éthanol



Spectre d'absorption de la vitamine D

Solvant : éthanol

Une revue générale des réactions proposées a été publiée par ERBE (28). C'est surtout la dichlorhydrine du glycérol qui est employée au dosage [KIMURA et FUJITA , (51)]. De même VENDT (118) détermine dans le même échantillon : vitamine A et caroti[illegible] grâce au 1-3 dichloro propane-2-ol activé par l'acide chlorhydrique à 1 %.

Signalons aussi les travaux de ROUIR (97) (98), qui tente le dosage simultané des vitamines A et D par la dichlorhydrine du glycérol, sans obtenir d'ailleurs une précision supérieure à 5 %.

VITAMINE D

On distingue classiquement les 3 vitamines suivantes :

Vitamine D_2 ou calciférol dérivant de l'ergostérol,
Vitamine D_3 dérivant du 7-déhydrocholestérol,
Vitamine D_4 dérivant du 2 2-dihydroergostérol.

Ce sont des substances cristallisées dont les propriétés physico chimiques sont assez voisines pour que nous puissions, sur le plan analytique, les réunir sous le vocable général de"vitamine D" .

La vitamine D est soluble dans les graisses et les solvants organiques, insoluble dans l'eau. Elle est moins oxydable à l'air que l'axérophtol mais sa stabilité n'est guère plus grande.

La vitamine D se rattache par les provitamines dont elle dérive, au groupe des stérols caractérisés par la présence dans la molécule du cyclo-pentano-perhydrophenanthrène.

La formule(fg. ci-contre)indique la présence :
- d'une fonction alcool,d'où la possibilité de formation d'esters et de la cétone correspondante,
- de trois doubles liaisons conjugées dont la place a pu être fixée dans le cycle B.

L'indication du titre des préparations de vitamines D se fait encore aussi en unités internationales correspondant à 0,025 µg de calciférol.

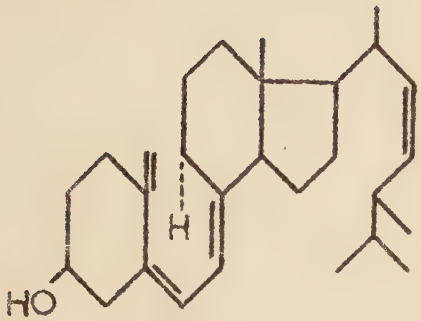
Propriétés optiques des vitamines D

Les vitamines D présentent un maximum dans leurs spectres à 265 mµ. L'absorption spécifique $E\ \frac{1\ \%}{1\ cm} = 500$ est nettement inférieure à celle de la vitamine A mais cependant utilisable en vue d'un dosage. Le contrôle spectrométrique en solution pure est possible, mais le dosage est très souvent perturbé par les substances voisines. L'étude graphique autorise parfois des corrections;mais aucune méthode générale n'a été établie. Lorsque le spectre s'éloigne par trop du spectre théorique on préfère abandonner la méthode spectrométrique au profit de la colorimétrie. De façon générale "la spectrométrie de la vitamine D a mauvaise réputation,hors du cas des solutions pures" (RAOUL).

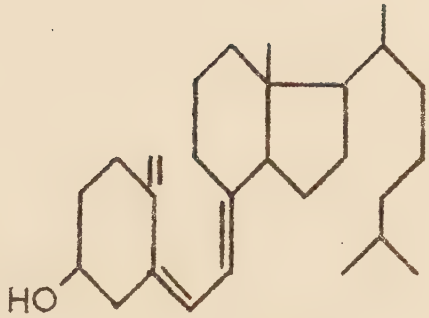
Réactions colorées des vitamines D

Les réactions que l'on cite dans la littérature sont extrêmement nombreuses. Elles peuvent servir à l'identification mais nécessitent des quantités assez importantes de vitamines pour être probantes :

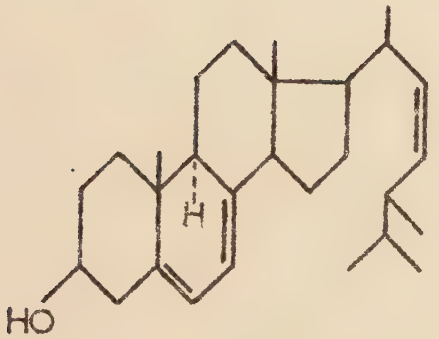
- coloration rouge virant au bleu avec l'acide trichloracétique (ROSENHEIM),
- coloration bleue après traitement par l'acide acétique puis par le brome en solution chloroformique (TORTELLI, JAFFE),
- coloration jaune orange avec l'acide nitrique (ROSENHEIM et CALOW),
- coloration avec l'acide acétique, le chlorure de zinc et le chlorure d'acétyle (TSCHUGAEFF) ou le chlorure de benzoyle (BERNOUILLI).



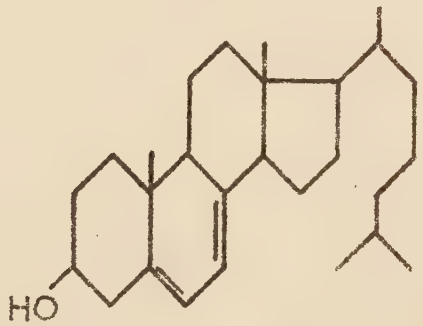
Vitamine D2



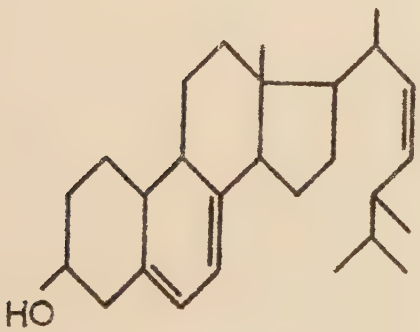
Vitamine D3



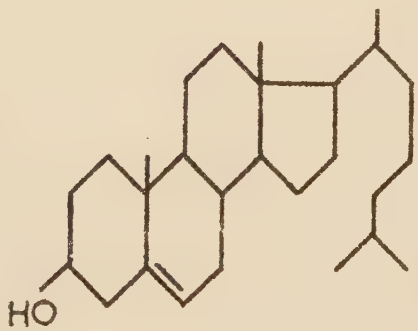
Provitamine D2



7 dehydrocholesterol



Ergostérol



Cholesterol

D'autres réactions, plus sensibles, ont donné lieu, avec plus ou moins de succès, à des applications quantitatives. SHEAR en 1925 (106) utilise un réactif acide chlorhydrique-aniline. STOLTANER (108) emploie P_2O_5, mais CHRISTENSEN (12) démontre le manque absolu de spécificité de cette réaction.

CRUZ-COKE (15) traite une solution alcoolique de vitamine D par l'acide chlorhydrique et observe une coloration verte. MORSMAECKER (70) pratique sur la solution alcoolique une réaction de LIBERMANN un peu modifié ; il obtient une coloration jaune. ROBINSON (92) propose un dosage colorimétrique de la solution de calciférol fondé sur la réaction donnée par le nitrite de sodium en milieu acétique. HALDEN et TZOLI (42) en 1936 se servent dans le même but de la coloration violette apparaissant après traitement par le chlorure d'aluminium anhydre et le pyrogallol.

Aucune de ces techniques n'a résisté à l'épreuve du temps; elles ont été délaissées au profit de la réaction au trichlorure d'antimoine sur laquelle BROCKMANN et CHEN (5) puis CARR et PRICE (10) ont attiré l'attention.

Malgré les avantages universalement reconnus du réactif de CARR et PRICE, certains de ces inconvénients ont provoqués de nombreuses recherches pour obtenir une bonne détermination colorimétrique des vitamines D. Tel est le cas des travaux de LYNESS (62) qui effectue le dosage par mesure de l'absorption à 450 mμ, de la solution de vitamine additionnée de dichlorure d'iodoethylène. La coloration obtenue est sensibilisée par addition de composés du type parachlorobenzoate de mercure. LAMBERT (56) utilise la même réaction après en avoir modifié les conditions. De son côté LAUGHLAND (58) a proposé l'emploi d'un réactif furfural - acide sulfurique concentré. SOBEL et Collaborateurs (107) mettent à profit la coloration violette provoquée par la dichlorhydrine du glycérol. GREEN (40) fait une lecture de

l'absorption à 604 mμ après addition de trichlorure d'iode.

L'abondance des réactions proposées laisse un doute sur leurs valeurs respectives. Le plus souvent : stérols, vitamine A et caroténoïdes interfèrent, si bien qu'il est logique de s'orienter vers l'isolement préalable des vitamines D avant de pratiquer ces réactions.

Etude particulière du réactif et de la réaction de CARR & PRICE

A la suite de ROSENHEIM et BRUMOND (94), CARR et PRICE (10), ainsi que nous venons de le rappeler ont essayé de nombreux réactifs pour la détermination de la vitamine A, particulièrement dans les huiles : trichlorure d'antimoine ou d'étain en solution chloroformique, tétrachlorure de silicium, oxychlorure de phosphore, etc... C'est le trichlorure d'antimoine,dont l'emploi leur semble le plus facile, qui a été finalement retenu. Nous avons vu que ce même réactif réagit aussi avec les vitamines D.

Préparation du Réactif

A l'origine le réactif est simplement constitué par une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme dont le titre est environ de 30 %. La réaction colorée donne des résultats à peu près comparables à ceux obtenus par la méthode biologique.

Cependant, peu à peu, le réactif initial a été modifié afin d'améliorer sa conservation, d'augmenter sa sensibilité et d'obtenir une reproductibilité meilleure des résultats .

En 1940, NIELD et Collaborateurs (79) recommandent une solution à 22 % de trichlorure d'antimoine récemment distillé, dans du chloroforme sec et privé d'alcool. Une solution de 2,5 ml p.cent de chlorure d'acétyle assure à ce réactif une conservation de plusieures semaines à l'obscurité.

COORD (13) ayant suggéré le remplacement du chloroforme, solvant instable, par le dichloroéthane, de WITT et SULLIVAN (19) préparent un réactif en pulvérisant 20 gr de trichlorure d'antimoine et 10 gr de chlorure de calcium anhydre dans un mortier. La poudre obtenue est alors traitée par 100 ml de dichloroéthane et filtrée sur sulfate de sodium anhydre. On ajoute enfin 2 ml de chlorure d'acétyle. Le réactif reste utilisable pendant au moins 10 semaines.

En 1953, KANZAWA et MINA (48) reprennent entièrement la question et publient une étude très complète. En particulier ils déterminent l'influence de la lumière et de la température sur la réaction conduite avec le réactif de NIELD. L'addition d'une petite quantité d'anhydride acétique est envisagée. Il ressort de leurs travaux qu'à la condition d'utiliser un réactif préparé avec des produits soigneusement purifiés et desséchés, le réactif de NIELD, sans anhydride acétique, est encore le meilleur. C'est en tous cas le moins influencé par les conditions extérieures. Ces résultats ont été généralement confirmés : (8), (9), (81), (82).

Pour certains auteurs, le réactif doit être différent selon que l'utilisation est prévue pour le dosage de l'une ou de l'autre des vitamines. C'est ainsi que dans les techniques de RAOUL et MEUNIER (68), le dosage de l'axérophtol fait appel à une solution saturée de trichlorure d'antimoine (Cl_3Sb) dans le chloroforme, alors que pour le dosage du calciférol le réactif comprend en outre : anhydride acétique et acide sulfurique concentré.

Spécificité de la réaction

La réaction de CARR et PRICE donne une coloration bleue (maximum d'absorption à 620 mμ) avec l'axérophtol, jaune orangé avec les vitamines D (maximum d'absorption à 550 mμ). Malheureusement toutes les substances de structure chimique voisine, réagissent aussi et provoquent des interférences : tel est le cas surtout des caroténoïdes et des stérols ainsi

que nous l'avons déjà signalé.

D'autres corps, heureusement moins répandus, donnent aussi une coloration avec le trichlorure d'antimoine : l'alcool allylique, les acides oléique et linoléique, le géraniol, le pinène, la pyridine, la lécithine, certains hétérocycles pentagonaux tels le pyrrol, le furfural, le thiophène, etc... sont dans ce cas (14), (61).

Par ailleurs les oxydants, comme le brome, augmentent l'intensité de la coloration, alors que, au contraire, les acides minéraux forts l'inhibent plus ou moins.

En conclusion les conditions du dosage ainsi que les substances accompagnant les vitamines, doivent être bien connues. Dans de nombreux cas on doit s'attendre à une réaction complexe où plusieurs substances différentes interfèrent. Ce n'est que dans certains cas simples que l'indétermination peut être partiellement levée, comme nous allons le voir.

Conduite du dosage

Vitamine D. - La coloration obtenue est très instable et disparait totalement en quelques minutes. Ceci oblige : soit à des mesures d'absorption à des intervalles de temps soigneusement fixés après mise en présence de l'échantillon avec le réactif, soit à une détermination de la cinétique de la réaction. C'est une complication, certes, mais une source d'avantages car, la vitesse de disparition de la coloration étant variable avec les produits envisagés, il est parfois possible d'opérer des corrections éliminant l'action de substances parasites. Un bon colorimètre peut suffire au dosage mais pour des déterminations fines, on utilise de préférence le spectrophotomètre. Dans le cas du calciférol on fera la lecture à 500 mμ et l'on contrôlera l'absence des stérols en vérifiant que l'extinction est pratiquement nulle à 550 mμ (NIELD et RUSSEL). Si le milieu est plus complexe, on peut faire des mesures de 30 en 30

secondes pendant 5 minutes (de WITT et SULLIVAN). En effet , les stérols possèdant une double liaison tels que le cholestérol,ne donnent une coloration que très lentement. Les stérols à deux doubles liaisons conjugées dans le cycle B, comme les provitamines, donnent une coloration stable durant plusieurs minutes. Enfin les stérols à trois doubles liaisons conjugées comme les vitamines D se colorent immédiatement mais de façon fugace. L'étude de la courbe d'absorption en fonction du temps fournit donc des indications plus complètes qu'une simple lecture au bout d'un temps donné.

Citons encore à ce sujet les travaux de SHAW et JEFFERIES (105) qui ont étudié l'intensité relative des colorations fournies par les stérols au cours de la réaction de CARR et PRICE. On peut ainsi voir que leur importance est très variable.

Vitamine A. - La coloration bleue fournie par la vitamine A présente un spectre à deux bandes caractéristiques : l'une à 580 mμ, l'autre, beaucoup plus importante, à 620 mμ. Les quantités que l'on peut doser sont très faibles par suite d'une intensité de coloration particulièrement importante . Il s'agit d'une méthode très sensible. Dans tous les cas on détermine l'absorption initiale par des lectures de 30 en 30 secondes (68).

Les quantités requises dans la prise d'essai sont de l'ordre de 10 U.I. ce qui-du point de vue de la sensibilité-est comparable à la sensibilité du dosage spectrométrique direct.

Des coefficients établis empiriquement permettent de passer de la mesure de l'absorption au taux de vitamines A ou D exprimés en Unités Internationales (unités biologiques).

Mécanisme de la réaction de CARR et PRICE

L'étude de la réaction de CARR et PRICE mérite d'être poussée plus loin. Cette étude, en effet, met en évidence une analogie avec ce qui a lieu au cours de la chromatographie sur colonne de l'axérophtol. Les travaux de MEUNIER et VINET (69) sur la mésomérie font ressortir un parallélisme entre la coloration en présence du trichlorure d'antimoine et certains phénomènes observés au cours du passage de l'axérophtol sur certains adsorbants tels que l'alumine activée ou les argiles acides. Ce passage provoque l'apparition d'anneaux bleus. Il semble donc que ce soit l'adsorption qui provoque ce phénomène. Or, on peut isoler au cours de la réaction de CARR et PRICE au prix d'un refroidissement du milieu à moins 55° C, une huile bleue contenant le trichlorure d'antimoine. Il y aurait passage d'une forme polyénique à une forme rappelant les cyanines : l'oscillation des cinq doubles liaisons entre plusieurs positions spatiales également probables expliquerait les caractéristiques spectrales de la réaction. Une confirmation de ces conceptions est donnée par le fait que l'on obtient un spectre tout à fait comparable en faisant réagir le trichlorure d'antimoine sur le farnésol, qui contient également dans sa formule cinq doubles liaisons conjuguées.

Nous verrons plus loin que la conception de MEUNIER et VINET permet de prévoir la nature des altérations que subit l'axérophtol au cours de certaines chromatographies sur colonne.

On peut généraliser ces phénomènes d'halochromie dans le cas des vitamines D. Il n'y a dans celles-ci que deux doublets oscillants au lieu de cinq comme dans la vitamine A, mais la même loi s'applique et le maximum d'absorption est simplement déplacé.

Méthodes diverses

En dehors de la spectrométrie ultra violette et de la colorimétrie, de nombreuses méthodes particulières ont été préconisées pour le dosage de l'axérophtol et du calciférol. Aucune d'elles ne permet le dosage simultané des deux vitamines. Nous les signalons ici pour mémoire :

- dosage polarographique de l'axérophtol proposé par KELLER et WEISS (50),
- dosages fluorimétriques utilisés par DENK (18) ainsi que par MULLER (75),
- mesure de l'absorption dans l'infra-rouge pour la détermination du calciférol dans les produits d'irradiation de l'ergostérol : PIRLOT (87) et EMBREE (25).

Par ailleurs les différences de solubilité et des précipitations sélectives ont été mises à profit :

- l'éthanol à 72 % permet de séparer les vitamines D des provitamines,
- la digitonine précipite les stérols, alors que les vitamines D ne se combinent pas et peuvent être extraites par le tétrachlorure de carbone : méthode préconisée par GREEN (41),
- l'anhydride maléique donne un composé insoluble avec le tachystérol, alors que la vitamine D ne réagit que très peu , une "purification" est donc possible : méthode de FUJITA et AOYAMA (37).

L'emploi judicieux de ces propriétés, associé à des corrections de lecture spectrométriques aux divers stades de l'analyse, permet à MULDER (74) d'effectuer des dosages satisfaisants du calciférol dans des produits d'irradiation. Mais pour couvrir tous les cas possibles il ne lui faut envisager pas moins de huit opérations assez longues et toutes délicates : il ne peut donc s'agir là d'une méthode de routine.

Enfin on a proposé de détruire sélectivement l'une ou l'autre des vitamines par une irradiation ultra-violette soigneusement contrôlée; mais les altérations produites par par ces irradiations sont trop complexes pour que cette technique soit sûre.

o

c c

On peut donc conclure des données précédentes que les méthodes colorimétriques, en dépit de tous les artifices, ne permettent pas de résoudre le problème du dosage simultané des vitamines A et D dans leurs mélanges, ni même, dans bien des cas, des vitamines isolées puisque des corps voisins, biologiquement inactifs, ne sont pas différenciés par l'emploi des réactifs chimiques.

Il n'était cependant pas inutile de rappeler leur existence puisqu'aussi bien, certaines d'entre elles nous serviront par la suite à mettre en évidence les vitamines après qu'elles ont été séparées. Mais il apparait clairement que le problème de la séparation est le problème majeur. C'est à son étude que sont consacrés les chapitres suivants.

Chapitre III

Séparation des vitamines A et D

A). - Chromatographie sur colonne

Dans le domaine de la préparation des vitamines, la chromatographie sur colonne a donné lieu à de très nombreux travaux particulièrement fructueux. L'isolement des vitamines du milieu réactionnel peut se faire de façon élégante et il s'agit là d'un procédé industriel utilisé depuis plusieurs années. Il était donc normal de voir apparaître, pour le dosage des vitamines liposolubles, des techniques mettant à profit cette propriété.

Cependant, l'utilisation analytique des colonnes n'est pas toujours sans inconvénient. En premier lieu la difficulté technique du procédé demande une habitude longue à acquérir, malgré la facilité apparente des manipulations. En 2° lieu on se heurte à la quasi impossibilité de standardiser les adsorbants, ce qui conduit fréquemment l'opérateur à un échec lorsqu'il veut pratiquer une méthode qu'il n'a pas lui même mise au point. Ces écueils évités, il faut encore signaler la longueur des opérations, ce qui constitue un handicap important dans la manipulation de substances particulièrement fragiles. L'augmentation du temps d'exécution est souvent une conséquence de l'emploi necessaire de grands volumes de solvants, qu'il faut non seulement purifier mais évaporer d'où allongement du temps d'exécution.

Nous étudierons cependant quelques unes des méthodes proposées, car les négliger dans cet exposé serait oublier une des principales directions des recherches concernant le contrôle des vitamines A et D.

Dès 1936 BROCKMANN (5) sépare la vitamine D_2 des stérols sur colonne d'alumine, adsorbant très fréquemment utilisé depuis. En 1943 EWING (31) résoud le même problème grâce à une colonne de "superfiltrol" (1), méthode incomplète que l'auteur précisera en 1948 (30). En 1944 LEDERER , TCHEN et Collaborateurs (60) isolent la vitamine A esterifiée d'huile de foie de poissons : l'adsorbant est encore l'alumine, mais selon"l'activité"de celle-ci les résultats sont très variables, allant d'une séparation incomplète à la destruction complète de l'axérophtol. Heureusement BROCKMANN ne tardait pas à mettre au point un contrôle de l'activité des alumines pour chromatographie, fondé sur l'étude de la migration de colorants spécialement choisis, parvenant ainsi à définir une sorte d'échelle d'adsorption.

LEDERER, tenant compte de ces précisions, utilise une alumine d'activité II selon BROCKMANN, pour l'isolement par adsorption des vitamines des huiles de poissons dissoutes dans l'ether de pétrole. L'élution est menée de façon à obtenir six fractions en variant les solvants (éther de pétrole-benzène-ether, méthanol). La première fraction contient des esters de la vitamine A, les autres des produits de destruction indéterminés. L'axérophtol lui-même semble se trouver dans la 5ème fraction, mais il ne peut être correctement dosé par suite de la persistance de certains produits gênants. La méthode est donc d'application limitée.

En ce qui concerne l'isolement des vitamines D, de WITT et SULLIVAN (19) utilisent une colonne composée d'un mélange de magnésie et de terre à foulon, alors que MULLER (76) essaye avec succès une séparation sur des colonnes comprenant de l'alumine à 5 degrés d'activation successifs.

---

(1) Superfiltrol : une bentonite activée

En 1950 EDEN (22) perfectionne le procédé de LEDERER. Après avoir adsorbé sur de l'alumine d'activité II, une première élution par l'éther de pétrole libère la vitamine A, un lavage à l'éther donne une fraction II qui est rejetée, enfin une solution d'acétone à 20 % dans l'éther de pétrole entraîne l'axérophtol. Les rendements de l'opération sont de l'ordre de 90 %. Trois ans plus tard, GREEN (41) emploi une colonne de floridine (1) activée par l'acide chlorhydrique. Il constate que la vitamine A est détruite dans certaines conditions d'humidité et d'acidité de l'adsorbant, cette destruction permettant alors le dosage de la vitamine D qui est éluée par le méthanol. La pureté de celle-ci n'est cependant pas suffisante pour terminer par une mesure spectrométrique. Il faut préférer, d'après cet auteur, un dosage colorimétrique. Au cours de la destruction de l'axérophtol, GREEN est le premier à constater la coloration bleue prise par la colonne, phénomène que MEUNIER et VINET devaient ultérieurement interprèter. La même année, la méthode d'EDEN et améliorée par FUJITA et AOYAMA (37) puis par ONISHI (84) et MUNATA (83). Ces deux dermiers auteurs tracent les courbes d'élution en utilisant un collecteur de fractions pour analyser l'éluat centimètre cube par centimètre cube. Ils montrent ainsi que la technique est satisfaisante et publient les résultats suivants :

- le palmitate de vitamine A se trouve principalement dans la fraction 5,
- la vitamine A alcool a 2 maxima (fraction 7 et 30 correspondant vraisemblablement à la forme cis et à la forme trans),
- la vitamine D est dans le fraction 20 de même que le cholestérol, la cholesténone et l'ergostérol.

---

(1) Floridine : Terre à foulon spécialement traitée.

Mais, si cette méthode permet le dosage de la vitamine A, celui de la vitamine D ne peut s'effectuer dans ces conditions.

NINNI & NINNI (80) ont introduit l'adsorption sur résine échangeuse d'ions, mais à notre connaissance ils n'ont pas été suivis dans cette voie.

EWING et Collaborateurs (29) en 1954, reprenant les travaux de leurs prédécesseurs constatent que les méthodes proposées sont inefficaces ; ils recommandent alors deux chromatographies successives : la première sur "Superfiltrol" qui sépare vitamine A, caroténoïdes, pigments et certains stérols, la seconde sur alumine activée pour éliminer certains produits de décomposition de l'axérophtol et des corps du type du squalène. L'exactitude des résultats, parfois excellente, dépend de la richesse relative en vitamines liposolubles, et par suite le procédé n'est pas d'un emploi général. Mais surtout, les auteurs reconnaissent eux-mêmes que tous les lots de "Superfiltrol" ne conviennent pas. Un essai de normalisation de cet adsorbant les conduit à un échec : il faut s'en remettre au hasard pour retrouver un lot semblable à celui de l'essai primitif.

L'année suivante, MARIANI et CAVINA (64) publient une étude assez voisine. Ils utilisent la destruction sélective de la vitamine A par passage sur des terres activées du type bentonite. RINDI (91), propose une méthode originale, mais limitée à la séparation des diverses formes de l'axérophtol ; il utilise une colonne de polyéthylène en poudre dont l'élution ultérieure est faite au moyen d'acétone aqueuse à différents titres :

- l'acétone à 60% libère l'axérophtol,
- l'acétone à 80% libère l'acétate de vitamine A,
- l'acétone à 100% libère le palmitate.

L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'après un simple lavage de l'adsorbant, celui-ci peut être réutilisé de nombreuses fois, à l'inverse des colonnes d'alumine ou de

superfiltrol qui ne sont que difficilement récupérables.

Citons aussi un brevet déposé par EMBREE et HAWKS (26) où l'adsorption des deux vitamines est faite sur silicate double d'aluminium et de sodium . La vitamine A est éluée par l'ether de pétrole, la vitamine D par l'acétone, mais avec des rendements assez mauvais et variables avec la qualité du silicate.

En 1956, NUMATA (83)revient à l'alumine qu'il utilise pour la séparation d'un échantillon déjà partiellement purifié par voie chimique. Cet auteur indique que le calciférol lui aussi subit une altération en passant sur l'adsorbant. Il préconise alors le retour aux méthodes utilisant le superfiltrol.

RAOUL (89) en 1957 emploie une technique comportant une double chromatographie ; l'alumine non activée permet l'isolement de la vitamine A sous ses différentes formes, alors que la Floridine assure celui de la vitamine D. La même année TSCHAPKE et PLESSING (112)réussissent le fractionnement par fixation sur kaolin, suivie d'extraction par deux solvants différents. Ils réalisent ainsi une séparation très aisée . Malheureusement les divers échantillons de kaolin présentent de telles différences de propriétés que les auteurs abandonnent cet adsorbant au profit du talc activé (113) qui, à son tour est délaissé (114).

WILKIE , JONES et KLINE (121) proposent comme RAOUL une méthode comportant deux chromatographies successives. La première utilise une colonne d'oxyde de magnésium activé qui isole la vitamine A tandis que la vitamine D, trop impure, est passée sur alumine. Les auteurs insistent beaucoup sur les caractéristiques des adsorbants : il est nécessaire de tester leur activité avant toute détermination. Malgré ces précau - tions le spectre des vitamines isolées est beaucoup trop perturbé pour permettre un dosage spectrométrique. Il faut alors avoir recours à la réaction de CARR et PRICE.

WISS et GLOOR (122) comme RINDI, préconisent pour la séparation des différentes formes de vitamine A, une colonne de polyéthylène, le solvant étant l'isopropanol. Quelques mois plus tard, ils déclarent en outre possible la séparation des vitamines A et D, grâce à un nouveau système solvant : heptane-butanol tertiaire-méthanol-eau (123).

A la suite de ces études, fin 1958, SCHMALL, SENKOWSKI et Collaborateurs (101), regroupant tous les résultats antérieurs publient un dosage de la vitamine D en présence de la vitamine A comportant deux chromatographies : l'une sur poudre de polyéthylène (produit Américain HALIFAX remplaçant le produit Allemand de WISS), l'autre sur FLOREX XXS (1). Cette méthode semble résoudre tous les problèmes posés par l'analyse des préparations galéniques mais les conditions en sont très strictes et il faut envisager quatre modes opératoires successifs qu'il faut essayer les uns après les autres : les opérations sont donc fort longues. Comme tous les auteurs utilisant les colonnes de ce type, SCHMALL et Collaborateurs signalent la présence de bandes colorées soit en bleu soit en jaune et fortement fluorescentes. Des artifices opératoires leur permettent d'en attribuer l'origine à des produits de destruction de la vitamine A au cours des opérations de chromatographie. Seuls MUREA et BERCOVICI (77) annoncent avoir utilisé - mais hélas, sans donner de détails - une bentonite indigène ne détruisant pas l'axérophtol et rendant possible le double dosage, après séparation, des vitamines A et D. Ces résultats, que nous n'avons pu vérifier, semblent en contradiction avec les constatations de MEUNIER et VINET (69) rappelées plus haut. Selon ces auteurs, la structure électronique des argiles décolorantes ou acides (type bentonites, montmorillonite, floridine,...) est telle que l'adsorption s'y fait par de véritables liaisons ioniques.

---

(1) Florex xxs : Argile acide. Maille 60-100.

Dans le cas de l'alumine, il y a création de liaisons polaires, la fixation de l'axérophtol se faisant par l'intermédiaire de l'oxygène alcoolique voisin des doubles liaisons, fonctionnant comme donneur d'électron le plus actif. IL se crée alors un oxonium instable et des structures mésomères apparaissent, entraînant l'apparition de coloration bleue signalée par de nombreux auteurs. En d'autres termes l'adsorption s'accompagne d'un véritable remaniement des structures et donc d'une altération qui, selon MEUNIER et DULOU (67), aboutit à une transformation partielle en axérophtène (perhydro vitamine A) et surtout en éther bi-axérophtylique, pigment jaune également signalé par les auteurs. L'étude du spectre des substances apparues confirme cette interprétation. En bref, ce type d'adsorbant ne permettrait pas d'éviter l'altération des substances dont on se propose le dosage.

En ce qui concerne le calciférol, son passage sur des argiles ionisantes ne provoque pas l'apparition de coloration particulière. Cependant le mode de réaction avec l'adsorbant est analogue et, lors de l'élution, on peut prévoir l'apparition de tachystérol dont la présence a été effectivement confirmée par les travaux de Mlle THIBAUDET (110).

Le tachystérol présentant, comme la vitamine D, un maximum d'absorption à 265 mμ et l'intensité de la réaction de CARR et PRICE du tachystérol étant comparable à celle du calciférol, on peut admettre, compte tenu également de la faible proportion de tachystérol formée, que l'erreur commise dans le dosage reste faible. Il n'en reste pas moins que l'on doit tenir pour certaine la possibilité d'altération des vitamines par passage sur certains adsorbants"actifs".

Ajoutons que dernièrement LAMBERTSEN (57) signale que certaines substances pourraient, par leur présence, réduire le taux de destruction en se fixant de façon irréversible sur l'alumine à la place de l'axérophtol. Les pertes ne seraient alors que de 2 à 3 %.

B.- Chromatographie de partage des vitamines A et D

Un exposé complet des tentatives effectuées - et toutes semblent l'avoir été avec le dessein de parvenir à une analyse quantitative - devrait suivre l'ordre strictement chronologique. On pourrait aussi pour des raisons de commodité ou de clarté, envisager isolément la chromatographie de la vitamine A puis celle de la vitamine D et enfin celle de leurs mélanges.

En fait, vont nécessairement interférer, dans ce bref exposé, les problèmes relatifs aux solvants de transport des vitamines et à la "préparation" du support cellulosique qui est le plus souvent un papier imprégné de substances telles que la chromatographie se fasse en phases inversées, le support étant rendu hydrophobe, contrairement à ce qui a lieu dans la chromatographie ordinaire des substances hydrosolubles. Il ne sera donc pas toujours possible dans ce qui suit, sous peine de répétition, de suivre l'ordre chronologique ou logique.

Chromatographie de la vitamine A

DATTA en 1949 (16) a étudié le papier aluminé décrit semble-t-il pour la première fois par FLOOD (36). DATTA avait en vue la séparation de la vitamine A alcool, de ses esters, et des autres substances donnant une réaction de CARR et PRICE positive. Cet auteur n'indique pas de technique précise. HARDJE (44) en 1950 propose une technique voisine, également fondée sur l'emploi de papier aluminé.

Sur papier non imprégné, les tentatives d'isolement et de dosage chromatographique de la vitamine A semblent relativement peu nombreuses ; . on relève en 1956 une tentative de KAISER (47) de séparation, dans le sérum, des différentes formes de la vitamine A : alcool, acétate, et palmitate. Un solvant isopropanol-eau 1/1 en chromatographie ascendante résout le problème; la forme alcool ayant un Rf de 1, l'ester palmitique un Rf nul et l'ester acétique un Rf intermédiaire.

Dans la séparation de la vitamine A et du Tocophérol (vitamine E) BROWN (6) en 1953, utilise un papier imprégné aux silicones, le solvant étant constitué d'un mélange d'isonitrile et d'eau. La mesure de l'aire des spots, après révélation convenable, fournissant au dire des auteurs des résultats quantitatifs.

Chromatographie de la vitamine D

La littérature est beaucoup plus abondante au sujet des vitamines D qu'il s'agit d'abord, le plus souvent, de séparer de certains stérols, dans les milieux naturels.

Sur papier ordinaire, en 1950, McMAHON, DAVIS et KALNITSKY (63) séparent par chromatographie circulaire: cholestérol, 7-déhydrochclestérol, ergostérol ainsi que les vitamines D2 et D3. Leur méthode exige 3 essais successifs avec des solvants différents :

1) Phénol-méthanol-eau (13,5/30/56,5)
2°) Phénol-méthanol-eau (14/30/56)
3°) Méthanol-benzène-éther de pétrole (80/10/10)

Le papier aluminé est aussi utilisé par ROSSI(96) qui, la même année, signale la possibilité d'une chromatographie des vitamines D selon la méthode ascendante avec le benzène comme solvant. Le Rf de la vitamine D2 est alors de 0,458. L'élution est réalisée par l'alcool absolu, le spectre U.V. montrant une transformation en tachystérol.

FISCHER, KREKELS et HOVEL (33) en 1952, effectuent la séparation sur le même support mais utilisent, pour la révélation des vitamines, un procédé original qui sera repris par d'autres auteurs: ils placent sous le chromatogramme un papier photographique sensible et portent l'ensemble sous une lampe génératrice de rayons ultra-violets. Le support et les vitamines absorbant inégalement le rayonnement, le développement ultérieur du papier photographique révèle l'emplacement de ces dernières.

Les papiers acétylés ou benzoylés employés par Mac MAHON, DAVIS et KALNITSKY n'ayant pas donné à ces auteurs toute satisfaction, ils les remplacent par un papier imprégné de stéarochlorure de chrome, dont nous avons également fait un très large emploi personnel (voir page 80). Ce mode d'imprégnation avait auparavant,permis de réaliser la séparation du cholestérol et de la cholesténone par KRITCHEVSKY et CAVIN (54).

Mc.MAHON et ses Collaborateurs se déclarent également satisfaits de son emploi pour la séparation des vitamines D2, D3 du cholestérol, du 7-déhydrocholestérol, de l'ergosterol et des sitostérols (voir tableau ci dessous) ;

	CH_3OH 65 H_2O 10 Ether 25	CH_3OH 65 H_2O 20 Ether 15	CH_3OH 95 H_2O 5
Vitamine D2	0,86	0,80	0,91
Vitamine D3	0,88	0,70	0,91
Cholestérol	0,52	0,49	0,73
7èdéhydrocholestérol	0,56	0,48	0,67
Ergostérol	0,55	0,43	0,68
Sitostérol	0,55	0,43	0,65

TABLEAU I

Toujours avec ce support, et en utilisant la technique de MUELLER,Mc MAHON et Collaborateurs sont parvenus - rappelons le - à doser le 7-déhydrocholestérol (73). C'est la gamme étendue des possibilités offertes par l'imprégnation au stéarochlorure de chrome qui nous a conduit à en généraliser l'emploi.

En 1954, KODICECK et ASHBY (53) introduisent une méthode sur papier paraffiné due à EGGITT et WARD (24) qui dosaient ainsi la vitamine E. Ils confirment les résultats sur papier au stéarochlorure de chrome, mais remarquent que le lumistérol et les suprastérols ont dans ces conditions les mêmes Rf que les vitamines D.

Le travail de KODICECK et ASHBY est un des plus important et des plus complet concernant notre sujet. Plus de 100 systèmes solvants ont été expérimentés, dont les meilleurs sont rappelés dans le tableau suivant :

	1	2	3
Ergocalciférol	0,44	0,66	0,69
Cholécalciférol	0,46	0,68	0,68
7-dehydrocholestérol	0,36	0,57	0,68
Ergostérol	0	0,56	0
Lumistérol	0,27	0,56	0,52
Suprastérol	0,36	0,52	0,57
Cholestérol	0,29	0,49	0,59
Sitostérol	0	0,51	0,42
Alpha tocophérol	0,15	0,58	-
Beta "	0,26	0,72	-
Gamma "	0,45	0,77	-
Vitamine A	0,93 - 0,98	-	-

1- Ethylène glycol monoéthyléther. Propanol. CH_3OH. Eau 35/10/30/25.

2- Propanol. Méthanol. Eau 15/82/3

3- Méthanol-Eau 95/5.

TABLEAU II

Ce tableau donne en outre les Rf de quelques stérols rencontrés au cours des séparations. KODICECK et ASHBY ont utilisé comme FISCHER et ses collaborateurs (33) la révélation "photographique", et, plus simplement, le simple repérage en lumière U.V. des spots fluorescents. Ils ont également préconisé, après ce repérage nécessaire, l'élution des spots et le dosage spectrométrique des éluats, avec un rendement de 92 % $\pm$ 12 %, mais ceci uniquement dans le cas des vitamines D et en l'abscence de vitamine A.

En 1958, HEINAMEN et MITTY (43) après avoir étudié les diverses méthodes proposées, adoptent le papier paraffiné imprégné de kérosène (pétrole). Ils concluent à la supériorité des systèmes de solvants préconisés par KODICECK et dosent la vitamine D par mesure de l'aire des spots.

L'annonce de ces résultats favorables devait entraîner de nombreuses vérifications. Toutes n'ont pas été favorables : MAYER, PICARD et WOKES (66), en 1958, sont en désaccord. Ils ne retrouvent pas les mêmes Rf, qui semblent varier avec les quantités déposées. De plus, l'étude du spectre montre une décomposition au cours de la chromatographie. Les auteurs font alors une étude systématique des facteurs de décomposition dans le but de tenter une élution quantitative mais doivent conclure : "le but de nos recherches : trouver une méthode de chromatographie quantitative sur papier des vitamines D n'est pas atteint et ceci pour deux raisons : l'instabilité des vitamines et leur élution incomplète".

Tout récemment BOCCACCI en 1958 (4) décrit la séparation des vitamines A et D sur papier imprégné avec une solution d'huile d'olive dans l'éther de pétrole en utilisant comme solvant l'acétone à 30 % d'eau. L'élution des vitamines D (Rf = 0,15) est réalisable ainsi que le dosage spectrométrique ou colorimétrique de la vitamine D. BOCCACCI (4) annonce une erreur de moins de 2 p. 100 "dans les cas normaux". Par contre, la vitamine A parait à cet auteur se décomposer en cours de

séparation; elle donne alors plusieurs spots et son dosage est impossible.

Deuxième partie

T R A V A I L P E R S O N N E L

INTRODUCTION

Lorsque nous avons entrepris ce travail, l'emploi des papiers paraffiné et aluminé, nous paraissait devoir résoudre le problème qui nous était proposé, problème consistant rappelons-le, à mettre au point une méthode correcte de séparation quantitative et de dosage des vitamines A et D en mélange. Ce n'est que beaucoup plus tard, et devant certaines difficultés expérimentales apparues en cours d'étude que, nous aidant d'une recherche bibliographique plus poussée, nous avons retrouvé, dans la littérature, l'emploi de l'imprégnation au stéaro-chlorure de chrome, déjà mentionné précédemment.
Pour les raisons déjà exposées dans l'introduction, le guide de ces recherches (Professeur B.DREVON) avait jugé opportun de limiter l'étude qu'il nous confiait au cas des mélanges de deux vitamines pures, se réservant, si les premières tentatives s ' avéraient heureuses, de généraliser la méthode aux cas plus complexes.

Si le procédé chromatographique était laissé à notre choix, avec charge d'en étudier en détail les modalités, il nous était demandé par contre, pour ledosage proprement dit, de nous en tenir si possible à la méthode spectrométrique

jugée à priori moins sujette à caution que les nombreuses méthodes colorimétriques connues.

En arrivant au Laboratoire, nous avons eu la chance de trouver - largement avancées déjà - les recherches préliminaires dues à Mlle Hélène LAFONT (1) , recherches qu'il nous a suffit de reprendre et de préciser sur quelques points pour nous convaincre que les issues possibles se trouvaient dans des voies en nombre heureusement limité.

En bref, notre travail personnel a consisté

1) dans la vérification de la méthode spectrométrique appliquée aux éluats,
2) dans l'étude des papiers paraffinés,
3) dans celle des papier aluminés,
4) à la suite de ces vérifications, nous avons, en faisant l'étude systématique des rendements de l'élution, été conduit, non seuleument à envisager l'emploi d'un papier imprégné au stéaro chlorure de chrome, mais encore à normaliser les conditions de la chromatographie pour éviter la photolyse et l'oxydation de l'axérophtol.

Les chapitres suivants relatent dans cet ordre même les résultats de notre travail personnel.

---

(1) le travail non publié, de Mlle LAFONT, interesse essentiellement a) les chromatographies sur colonne d'alumine ou de floridine, b) les essais d'imprégnation des papiers à la paraffine, c) l'élution à froid et au Kumagawa, ainsi que l'étude presque exhaustive des systèmes solvants. Nous tenons à exprimer à Mlle LAFONT - - qui entre temps, avait quitté le Laboratoire - notre reconnaissance pour nous avoir permis de faire état de quelques-uns de ses résultats.

PRODUITS UTILISES

1) Vitamines

Tous les échantillons de provitamines, de vitamines, de substances voisines, proviennent de deux sources :

- Laboratoire de recherches de la Société de Chimie Organique (ex Alimentation Equilibrée) à Commentry : Directeur Scientifique : Monsieur le Docteur VIGNERON)
- Laboratoire ROUSSEL-UCLAF, à Romainville. Directeur Scientifique : Monsieur le Professeur L. VELLUZ.

Nous tenons à remercier ces deux firmes françaises, et leurs Directeurs Scientifiques, d'avoir bien voulu nous envoyer les produits nécessaires.

2) Adsorbants

En ce qui concerne les adsorbants, nous sommes redevables à Monsieur le Professeur RAOUL, Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS, de l'envoi d'un important échantillon de Floridine d'origine américaine.

3) Solvants

Tous les solvants utilisés ont été soit des solvants "Codex" soit des solvants pour chromatographie de marque RHONE POULENC que nous avons pris la précaution de redistiller ou de purifier. Nous indiquerons éventuellement, dans chaque cas particulier les traitements que nous avons fait ainsi subir aux réactifs.

4) Réactifs divers : Produits purs PROLABO.

5) Matériel

Le matériel à chromatographie est d'une conception si simple qu'il est à peine besoin d'en parler; ce sont, le plus souvent de larges éprouvettes cylindriques de forme haute à bord rodé, ou des cuves rectangulaires, également à bord rodé,qui ont été utilisées. La fermeture, pratiquement étanche, était constituée par une épaisse plaque de verre rodé,de forme convenable, percée en son centre d'un ou deux trous circulaires susceptibles d'être obturés, soit par un bouchon de caoutchouc,soit par un bouchon rodé.

Les supports intérieurs, construits au Laboratoire avec des baguettes de verre ordinaire, ont été conçus soit pour la chromatographie ascendante, soit pour la chromatographie descendante, aucun dispositif ne sortant du cadre de la verrerie courante en usage partout.

Il s'ensuit que les modes opératoires préconisés et qu'on lira à la fin de ce travail, sont applicables dans tout Laboratoire de contrôle correctement installé.

Le seul appareil requis (pour le dosage proprement dit) est un spectromètre à optique de quartz de bonne qualité : nous avons fait constamment usage du classique spectromètre de JOBIN et YVON, référence "Maroc", à cuves de quartz de10 mm d'épaisseur, muni d'une lampe à hydrogène.

Pour quelques vérifications colorimétriques, nous avons utilisé l'électrophotomètre de P. MEUNIER.

Les repérages en lumière de Wood ont été faits avec la lampe Zeiss, avec ampoule à vapeur de mercure sous pression, munie d'un verre spécial de Wood, mais tout appareil similaire eût rendu les mêmes services.

Chapitre V

SPECTROMETRIE DES MELANGES D'AXEROPHTOL ET DE CALCIFEROL

Afin de déterminer les possibilités pratiques des mesures spectrométriques appliquées au dosage des vitamines A et D, nous avons réalisé les contrôles suivants :

- Pour la vitamine A, une gamme fut préparée extemporanément : les divers échantillons contenaient de 1 à 20 µg d'Axérophtol. Les solvants utilisés furent le cyclohéxane ou le méthanol.

L'absorption fut mesurée à 328 mµ (maximum pour l'Axérophtol). Le report sur un graphique des valeurs mesurées montre que les points étaient bien alignés sur une droite passant par l'origine. La reproductibilité était bonne et le dosage était aisément réalisé dans ces conditions, avec des erreurs de moins de 2 p. 100. Sur 20 mesures d'une même dilution l'écart type fut de 0,42 dans les conditions où nous opérions.

Donc en solution pure nous pouvions considérer le dosage spectrométrique satisfaisant en ce qui concerne l'Axérophtol.

- Pour la vitamine D les opérations furent menées de façon similaire à la longueur d'onde de 265 mµ (maximum d'absorption pour le Calciférol). Les résultats furent comparables à la seule réserve suivante : l'absorption pour une même quantité est nettement moins forte (4 fois environ) donc, le dosage est moins sensible. En solution pure nous pouvions donc, tout comme pour la vitamine A, retenir la spectrométrie comme une méthode valable.

o

o o

L'existence de maximum d'absorption nettement différents devait permettre, en principe, un dosage différentiel des deux vitamines. Nous avons donc composé des mélanges à partir de solutions pures de vitamines A et D. Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de ces mélanges présentait bien les 2 maximums attendus à 265 et 328 mμ. Nous avons alors dressé le tableau suivant :

Spectre n°	Vitamine A en μg/ ml	Vitamine D en μg/ ml	Rapport pondéral	Rapport des densités optiques à 328 & 265mμ
I	0,4	11	0,035	7,56
II	0,8	7,6	0,I06	2,91
III	1,2	3,8	0,315	1,19

L'examen des formules des médicaments composés renfermant des vitamines A et D, montre que le rapport pondéral vitamine A / vitamine D varie dans de larges limites et que, par conséquent le rapport des densités optiques à 328 et 265 mμ sera très variable. D'où il s'ensuit que les conditions optimales de dilution ne se trouveront pas réalisées pour une mesure d'absorption simultanée aux deux maximums, - ce qui est déjà un gros inconvénient - . Nous avons voulu savoir, de plus, si la présence d'une vitamine ne perturbait pas la valeur de l'absorption de l'autre à son maximum. Il fallait s'attendre à une réponse affirmative mais nous pouvions espérer faire une facile correction. Pour cela, nous avons réalisé une gamme d'échantillons contenant de 1 à 20 μg de vitamine D auxquels avait été ajouté une quantité fixe de vitamine A (5μg). L'absorption de chaque échantillon fut mesurée :

1°) à 328 mμ : celle-ci se révèle constante, c'est à dire que la vitamine D n'absorbe que très peu à cette longueur d'onde.

2°) à 265 mμ les valeurs obtenues reportées sur un graphique donnèrent une droite, décalée par rapport à l'origine, mais parallèle à la droite obtenue auparavant dans le cas d'une solution pure de vitamine D.

Dans cette série d'essais, la correction est donc possible et diverses déterminations nous ont montré que l'erreur à attendre est de l'ordre de 5 p. 100.

L'essai inverse fut beaucoup moins satisfaisant. Les échantillons de la gamme contenaient de 1 à 20 µg/ml de vitamine A et 10µg/ml de vitamine D. Les lectures d'absorption donnèrent les résultats suivants :
A 328 mµ les valeurs furent superposables à celles obtenues avec une gamme comparable de vitamine A pure. Le dosage est réalisable.

A 265 mµ les chiffres obtenus varièrent avec la teneur en vitamine A : aucune correction ne permet de doser la vitamine D, car la vitamine A perturbe fortement les lectures à cette longueur d'onde.

Ces essais - effectués à titre de contrôle - nous amenèrent à la conclusion suivante : "Lorsque la vitamine A existe dans le mélange à un taux inférieur à celui de la vitamine D, on peut doser les deux vitamines à leurs maximums d'absorption respectifs. Dans le cas inverse (taux de vitamine A supérieur à celui de la vitamine D), seule la vitamine A peut être dosée.

Par suite, il faut abandonner l'espoir d'un dosage spectrométrique direct. Il est absolument nécessaire d'opérer une séparation préalable des deux vitamines. Celle - ci réalisée, le dosage spectrométrique est valable et ce point explique la suite de nos recherches : trouver une méthode de séparation chromatographique et d'élution quantitative, suivies d'un dosage spectrométrique des deux vitamines dans les éluats, ces derniers se comportant comme des solutions pures.

Chapitre V

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER PARAFFINE (méthode de KODICEK et ASHBY (53)

Les premiers essais ont été effectués par H. LAFONT et nous les avons repris dans les conditions indiquées par les auteurs pré cités. Les bandes de papier "Arches 302" sont imprégnées par trempage pendant 1 à 20 minutes dans une solution dans l'éther de pétrole à 5 p.100 de paraffine solide "Codex". Aussitôt après, les bandes sont égouttées et séchées. La chromatographie est faite par voie ascendante et dure quinze heures. La durée de trempage est sans influence sur les rendements; on peut considérer avec KODICEK et ASHBY qu'un trempage de cinq minutes est suffisant. Les quantités d'axérophtol et de calciférol déposées sur les bandes ont varié dans nos essais, de 18 à 36 µg pour la vitamine A et de 13 à 26 µg pour la vitamine D.

Le repérage des spots a été fait par pulvérisation d'une solution de trichlorure d'antimoine à 24 p.100 dans le chloroforme redistillé. Ce traitement est appliqué après séchage rapide des bandes à l'étuve à + 50°C. Les solvants préconisés par KODICEK et ASHBY ont conduit aux Rf suivants :

1) Méthanol-Eau (95/5) Vitamine A Rf = 0
Vitamine D2 Rf = 0,35

2) Méthanol-Propanol- Eau(82=15-3) Vitamine A Rf= 0
Vitamine D2 Rf = 0,53

La séparation ne posant pas de problème, c'est le dosage des vitamines, sur leur support ou après élution qui a fait l'objet de nos efforts. Mais, en raison de sa

fugacité, la coloration des taches par le réactif de CARR et PRICE n'a été retenue que pour le repérage, sur une bande témoin, de l'emplacement des vitamines qui ont été soumises à l'élution.

En premier lieu, les "spots",découpés, ont été laissés en contact pendant deux heures à froid avec quatre ml de méthanol. Un essai à blanc était fait simultanément sur une surface égale de papier paraffiné provenant de la même bande, mais prélevée en un point exempt de vitamines.

L'extraction (sans chromatographie préalable) de quantités connues de vitamines, simplement déposées sur le papier, s'est faite dans ces conditions avec les rendements suivants :

Vitamine A	70 à 90 p. 100
Vitamine D	90 p.100

Après chromatographie de 15 heures les rendements tombèrent respectivement à 20-30 p. 100 et 60 p. 100. La substitution du méthanol par l'éthanol ne modifia pas le rendement. Nous avons alors étudié le rendement en augmentant la durée du contact entre le fragment de papier et le méthanol (5heures maximum) tout en agitant au moyen d'un vibreur de JOUAN. La quantité des vitamines retrouvées par spectrométrie dans l'éluat est de 95 p. 100 $\pm$ 3 sur le témoin n'ayant pas subi la chromatographie; elle tombe à 40 à 60 p.100 après chromatographie.

De toute évidence, ce n'était plus l'élution qui se trouvait déficitaire; il fallait accuser la chromatographie elle même. Rassuré sur le rendement de l'élution, rendu pratiquement quantitatif par l'agitation de 5 heures au moins pour des doses importantes de vitamines,il devenait possible d'étudier les autres facteurs, et en particulier l'influence de la quantité de vitamine utilisée au départ.

Si l'on dépose des quantités croissantes de vitamines afin de réaliser un étalonnage complet, le dosage des éluats par spectrométrie fournit non pas une droite mais une branche d'hyperbole. On pouvait, à la rigueur, tenir compte de l'allure de la courbe d'étalonnage en vue du dosage. Cependant des essais nombreux n'ont pas donné des résultats assez reproductibles pour que ce procédé soit retenu.

Nous sommes alors revenu, pensant que jouait , aux très faibles concentrations la loi d'adsorption de FREUNDLICH, à un procédé d'extraction qu'avait déjà utilisé H. LAFONT : l'épuisement continu par l'alcool absolu bouillant au kumagawa, pendant 20-30 minutes; Le résidu d'évaporation de l'alcool étant finalement repris par le cyclchexane en vue du dosage spectrométrique. Ce procédé, s'il donnait toute sécurité quant à l'extraction, ne pouvait que favoriser - comme nous le verrons par la suite - une destruction des vitamines. En outre, il entraîne un "déparaffinage"partiel du papier ce qui augmente exagérement la valeur du blanc. En l'absence de toute vitamine, l'extrait de papier paraffiné présente une absorption non négligeable à 326 et 265 mμ . Enfin les rendements de l'opération sont dérisoires : de l'ordre de 33 p. 100 pour la vitamine D et pratiquement nuls pour la vitamine A.

Le kumagawa fut alors remplacé par un "micro-Soxhlet" permettant d'utiliser moins de solvant (7,5 ml d'alcool absolu seulement). L'absorption des blancs s'est montréeplus faible et ralativement constante .

En ce qui concerne la vitamine D, une extraction poursuivie pendant 10 minutes donnait un rendement de 40 p.100, un chauffage de 15 minutes un rendement de 60 p. 100. Il pouvait alors nous sembler qu'en précisant très nettement les conditions opératoires il soit possible de parvenir à un rendement constant, mais l'élution de la vitamine A, conduite dans ces mêmes conditions, ne donnait pas de résultats satisfaisants. Nous avons définitivement abandonné ces tentatives.

Restait la possibilité d'une lecture directe de l'absorption sur la bande elle même, en faisant défiler celle-ci devant la fente du spectromètre, au moyen du dispositif décrit par DREVON et DONIKIAN (20). Cette nouvelle tentative n'a pas donné les résultats attendus, le fond de papier paraffiné présentant une absorption de base beaucoup trop forte par rapport à celle dues aux seules vitamines.

Le dernier chapitre de notre travail donnera la clé de nos échecs. Au moment ou nous les avons enregistrés, c'est toutefois l'irrégularité des rendements, toutes conditions restant égales par ailleurs, qui nous a le plus frappé, et c'est la raison pour laquelle nous n'avons pas cru devoir étudier plus avant la technique de KODICEK et ASHBY. Nous n'avons pas eu non plus le temps matériel d'y revenir en tenant compte des impératifs que nous préciserons au chapitre VI . Il nous semble toutefois que l'étude de la chromatographie en phase inversée sur papier paraffiné, bien que moins pratique que celle à laquelle nous avons donné plus tard la préférence, mériterait d'être reprise, au moins dans certains cas particuliers.

Chapitre VI

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ALUMINE

On a vu dans la première partie que ce support a été très largement utilisé pour la séparation chromatographique des vitamines liposolubles. Il jouissait par ailleurs au Laboratoire, d'une faveur particulière depuis le travail de J. LAUR (21) qui est parvenu à faire, sur papier aluminé, la séparation chromatographique des complexes ammonium-quaternaires/colorants acides, et à récupérer, pour les doser avec une approximation de $\pm$ 2 p. 100 les colorants les plus divers à des doses de l'ordre de 5 à 50 µg.

Préparation du papier aluminé

Le dépôt d'une couche d'alumine sur un support peut se faire de diverses façons. Nous avons utilisé le mode opératoire décrit par LAUR dans sa thèse (59). Les bandes de papier Arches 302 (27x400 mm) sont plongées dans une solution à 20 p. 100 de sulfate d'alumine pendant une quinzaine de minutes. Les bandes retirées sont ensuite essorées entre deux feuilles de papier filtre de façon aussi régulière que possible en évitant plis et bulles d'air. On les porte alors dans une solution d'ammoniaque officinale diluée au demi pendant dix minutes, puis dans une solution à 1 p.100 d'ammoniaque officinale pendant le même temps. On termine par un lavage abondant d'une nuit à l'eau distillée et l'on sèche. Cette préparation demande beaucoup de soin mais permet d'obtenir des feuilles homogènes et d'imprégnation régulière : les résultats sont alors absolument comparables d'une opération à l'autre.

Préparation des échantillons

Nous avons utilisé des dilutions de vitamines préparées extemporanément.

Pour l'axérophtol nous sommes parti. du concentré huileux titré à 210.000 U.I/gr de l' "Alimentation Equilibrée". Par pesée nous réalisions une solution à 2.000 µg/ml dans l'éther de pétrole, ceci au début de notre travail. Par la suite nous avons utilisé également des solutions dans l'éthanol.

Pour la vitamine D2 nous avons utilisé de même une solution à 2.000 µg/ml dans les mêmes solvants, à partir de calciférol cristallisé.

Ces dilutions se conservent très mal, même à la glacière et en s'entourant des précautions d'usage pour éviter l'évaporation du solvant. C'est pourquoi, tout au long de notre travail, nous avons préféré refaire des solutions fraiches, plutôt que de risquer une altération dont il est impossible de connaitre l'importance. La pesée à la microbalance METTLER au 1/100 de mg) et la mise en solution dans un volume (ou un poids) exactement connu du solvant choisi, la pesée, en tube capillaire, du soluté obtenu, procédé qui est de règle au Laboratoire pour toutes les vérifications fines, nous a donné toute garantie sur la quantité de vitamine déposée sur le papier.

Lorsque nous avons dû opérer sur des vitamines en mélange, nous avons en fait, au moyen de deux tubes capillaires différents, déposé sur le même point du papier des poids connus des solutés de vitamines ou de substances voisines.

Le tube capillaire est un simple tube de verre pyrex, convenablement effilé au chalumeau, dont la lumière a 0,5 à 1 mm de diamètre. Ce tube, sectionné perpendiculairement à son axe, est garni de soluté par aspiration (comme s'il s'agissait d'un hématimètre). Il est taré plein sur la

balance monoplateau, et pesé de nouveau après dépôt sur le papier d'une quantité suffisante de solution. Avec un peu d'habitude, et des capillaires de diamètre convenable, ce "prélèvement par pesée" se fait sans aucune difficulté, et sans qu'il y ait évaporation du contenu dans le capillaire, au cours des pesées et manipulations. Nous tenions à donner ces précisions qui valent pour tout notre travail.

Pour le travail courant, nous avons aussi fait usage de pipettes capillaires graduées, de 0, 01 et 0,02 ml, à bout conique rodé, du modèle utilisé pour l'électrophorèse du sérum (ELPHOR, Constructeur).

Chromatographie

Nous avons toujours utilisé la technique descendante. Un récipient contenant la phase mobile était fixé près du couvercle sur un support. Nous avons toujours mis une certaine quantité de solvant au fond de la cuve afin de saturer l'enceinte et ceci ne suffisant pas toujours, nous avons "tapissé" intérieurement la cuve de papier filtre. De cette façon, le solvant monte sur toutes les parois par capillarité. Les solvants utilisés étant très volatils il faut éviter toute fuite. Pour cela le couvercle doit être enduit de silicone "Rhodorsil" ce qui assure une excellente étanchéité.

Mode opératoire

La mise en place d'une chromatographie, sa révélation, obéissent à des règles si bien connues aujourd'hui que nous n'insisterons que sur les détails qui nous paraissent valoir la peine d'être signalés:

Tracer un trait à une dizaine de centimètres de l'extrémité de la bande. Déposer la prise d'essai au milieu de cette ligne en faisant une tache aussi petite que possible (diamètre inférieur à 5 mm). Le dépot est rapide par

suite de la volatilité du solvant utilisé. La bande est alors laissée dans la cuve pendant plusieurs heures afin qu'elle se sature d'humidité aux dépens de l'atmosphère. Sans cette précaution les résultats peuvent varier légèrement d'une opération à l'autre.

Introduire alors le solvant et laisser migrer sur une distance de 20 centimètres environ : le temps nécessaire est très variable et dépend des solvants utilisés.

En ce qui concerne les solvants eux mêmes, H. LAFONT en avait fait une étude très complète et les résultats de ses essais sont consignés au tableau III . On a souligné les solvants ou les combinaisons de solvants les plus interessantes.

Révélation

Aux procédés déjà mentionnés (fluorescence des spots (52) développement d'un papier photographique (33), s'ajoutent des moyens propres à la chromatographie et qui font usage de réactions que nous n'avons pas encore eu l'occasion de signaler :

Mc MAHON, DAVIS et KALNITSKY (63) suspendent la bande au dessus d'une solution de brome à 0,25 p. 100 dans du sulfate de dibromopyridine. Ils pulvérisent ensuite une solution saturée d'iodure de potassium dans le méthanol, puis une solution d'amidon à 20 p. 100. Les spots deviennent bleu foncé alors que la surface environnante reste incolore ou apparait quelque fois colorée en bleu clair.

De façon beaucoup plus courante, on a recours à l'iode, réactif très polyvalent. La mise en oeuvre de ce procédé peut se faire de plusieurs façons

a) - par pulvérisation d'une solution saturée d'iode dans l'éther de pétrole : le chromatogramme, uniformément brun après ce traitement se décolore au cours du séchage. Seules persistent une tache brun-vert à l'endroit où se trouve la vitamine A et une tache brune

Emploi des solvants seuls ou combinés en vue de la chromatographie ou de l'élution des vitamines A et D .

SOLVANTS (Les chiffres indiquent leurs proportions volumétriques dans les mélanges)	PAPIER ALUMINE	
	Vitamine A	Vitamine D
	Valeur des Rf	
Méthanol	0.95	0.95
Ethanol	0,9	0,8
Isopropanol	0,7	0,7
n-propanol	0,7	0,7
Butanol	0.2	0.2
Ether	0,1	0,1
Acétone	0,9	0,9
Ether de pétrole	0,1	0,9
Chloroforme	0,8	0,8
Benzène	0,95	0,5
Toluène	0,7	0,5
Cyclohexane	0,75	0,70
Hexane	1	1
Méthanol-Eau 95/5	1	1
Méthanol-Eau-Ether 30/10/10	1,	1 ,
Méthanol-Hexane 5/95	0,95	0,95
Méthanol-Propanol-Eau 82/15/3	1	1
Ethanol-Benzène 10/90	0,8	0,8
Ethanol-Benzène 6/94	0,90	0,75
Ethanol-Benzène 4/96	0,9	0,5
Ethanol-Benzène 2/98	0,9	0,85
Ethanol-Toluène 10/90	0,5	0,5
Ethanol-Cyclohexane 5/95	0,2	0,70

/

Ether de pétrole-Ethanol 94/6	1	1
Ether de pétrole-Ethanol 97/3	1	1
Ether de pétrole-Ether 90/10	0,1	0,1
Ether de pétrole-Ether 95/5	0,75	0,50
Ether de pétrole-Ether 98/2	0,85	0,70
Chloroforme-Ether de pétrole 80/20	0,75	0,80
Chloroforme-Ether de pétrole 90/10	0,75	0,80
Chloroforme-Ether de pétrole 96/4	0,85	0,85
Chloroforme-Ether de pétrole 99/1	0,95	1
Chloroforme-Toluène 10/90	0,85	0,70
Chloroforme-Ether	0,30	0,50
Ether-Toluène 5/95	0,15	0,15
Acétone-Benzène 10/90	0,95	0,95
Acétone-Benzène 5/95	0,98	0,80
Acétone-Benzène 2/98	0,95	0,80
Acétone-Toluène 10/90	1	1
Acétone-Toluène 2/98	1	1

TABLEAU III

à l'emplacement du calciférol. Malheureusement la décoloration du papier aluminé n'est pas toujours régulière et des artefacts assez nombreux gênent la lecture.

b) - par suspension de la bande dans une enceinte close au dessus d'une petite quantité d'iode en cristaux. Les vapeurs d'iode font apparaître les taches progressivement. L'inconvénient de cette méthode, très sensible, est sa lenteur. Dans notre cas le laps de temps nécessaire (plusieurs heures) était inadmissible.

Aussi le plus souvent avons nous eu recours à la pulvérisation d'un réactif au trichlorure d'antimoine. Sa sensibilité dans le cas de l'axérophtol est excellente : avec moins d'un µg de substance il apparaît une tache bleue très nette. La vitamine D2 n'apparaît qu'après chauffage vers + 50° C. Nous réalisons ce chauffage au moyen d'une soufflerie d'air chaud : il se produit une tache jaune-orangé pour des quantités de l'ordre de 2 à 3 µg de calciférol. Il convient de tracer immédiatement à la mine de plomb le pourtour des spots, car la coloration - surtout celle de la vitamine A - disparait en quelques secondes.

Nous avons utilisé un réactif de composition :

Cl_3Sb 22 g,
$CHCl_3$ purifié 100 ml,

Après dissolution et filtration ajouter :

Chlorure d'acétyle 2 ml,
Anhydride acétique 1 ml.

Au réfrigérateur, en flacon jaune, bouché à l'émeri, la conservation de ce réactif est de plusieurs semaines.

Résultats

Pour l'étude systématique des solvants nous avons déposé sur la bande 10 µg de vitamine A et 20 µg de vitamine D. Plus de 50 systèmes solvants ont été essayés. Dix d'entre eux nous ont donné des résultats interessants (voir tableau III).

Nous avons finalement retenu le système : ether de pétrole saturé de propanediol qui permet la séparation en deux heures, l'obtention de taches suffisemment nettes et le repérage aisé du front du solvant ce qui n'est pas toujours le cas avec les autres. Les Rf obtenus sont très constants et identiques, que l'on parte d'une solution pure ou d'un mélange. De nombreux essais nous ont donnés les valeurs suivantes :

Axérophtol Rf = 0,90
Calciférol Rf = 0,15

Nous avons parfois remarqué la présence d'une légère trainée fugace près de la ligne de départ que le réactif de Carr et Price révèle en rouge violacé.

L'apparition de cette coloration juste au point de dépot conduit à admettre qu'elle est dµe à la faible quantité d'huile servant de véhicule au concentré de vitamine A utiliserdans nos essais.

D'autre part, la trainée est beaucoup plus nette lorsqu'on utilise une dilution conservée depuis un certain temps. Il est donc permis de penser que la trainée est due à des produits d'altération apparaissant au cours du stockage; nous avons vu que nous avons évité celui ci en préparant toujours des solutions fraiches.

Dosage

Bien que délicat, le dosage effectué après séparation chromatographique sur papier aluminé a donné de bons résultats dans un certain nombre de cas. Les déterminations quantitatives peuvent se faire de deux façons différentes :

- par étude des spots après révélation,
- après élution.

Etude des spots : les procédés sont nombreux :

- mesure de la surface de la tache, théoriquement proportionnelle au logarithme de la quantité déposée (102), (103), (32), (34),

- mesure de l'intensité de la coloration soit en lumière transmise soit en lumière réfléchie. L'intensité maximum est, là encore, proportionnelle au logarithme de la quantité déposée.

- combinaison des deux procédés selon MYKOLAJEWYCZ (78) le premier mode d'appréciation donnant des chiffres par excès, le second par défaut.

Les mesures peuvent se faire directement sur chromatogramme ou sur le négatif photographique obtenu à partir de celui-ci.

Elution

Nous avons préféré ce procédé pour plusieurs raisons :

1) la photométrie ou la planimétrie des taches est délicate et nécessite, pour être faite avec une précision suffisante des instruments coûteux,
2) la révélation ne conduit pas à une coloration stable,
3) les deux vitamines ne sont pas mises en évidence dans les mêmes conditions : la vitamine A est révélée à la température ordinaire, la révélation de la vitamine D doit se faire à chaud.

Elution de la vitamine A

La fragilité de cette substance, la valeur élevée de son Rf, nous ont fait donner la préférence à une méthode demandant le moins de manipulations possibles. La bande de cellulose ayant servi à la chromatographie descendante (largeur 5 cm) est taillée en pointe à son extrémité inférieure. On dispose au dessous de cette pointe, sur un support l'isolant du fond de la cuve à chromatographie, un récipient de

verre d'une capacité de 10 ml environ. La phase mobile, après avoir parcouru tout le papier, perle à l'extrémité de cette pointe et peut être immédiatement recueillie. Au cours des 24 heures que dure la chromatographie, on recueille environ 5 ml d'éluat. L'avantage de ce procédé réside dans le fait que toute l'opération se déroule automatiquement à l'inté - rieur de la cuve close.

La révélation du chromatogramme confirme la disparition complète de la vitamine A. Après récupération de l'éluat celui ci est complèté à 10 ml avec de l'éther de pétrole. La solution dans l'éther de pétrole est examinée au spectromètre au maximum d'absorption (328 mμ). Plusieurs bandes peuvent être traitée simultanément dans la même cuve.

Un essai à blanc nous ayant indiqué que le solvant entraînait des impuretés du papier, ce qui provoque un fond spectral "gênant", les bandes utilisées pour la chromatographie ont toujours été lavées par le solvant avant l'emploi : l'absorption correspond alors uniquement à la vitamine A présente.

Les résultats obtenus figurent au tableau I V.

		Quantité déposée.	Quantité retrouvée	Erreur relative
Essai	I	5	3,5	- 30 %
	II	10	6,8	- 32
	III	15	10,2	- 32
	IV	20	12,6	- 37
	V	10	6,7	- 33

TABLEAU I V.

Ces résultats témoignent d'une perte importante, mais pratiquement constante qui ne peut être rapportée qu'à deux causes possibles :

- une élution incomplète,
- une destruction au cours des opérations.

Nous avons alors tracé le spectre et effectué la construction de VACHER (voir page 28). Les cordes B et C correspondant aux intervalles 312,9-339,8 et 306,1-345,0 mμ se coupent du côté des grandes longueurs d'onde au lieu d'être parallèles. Il faut en conclure d'après cet auteur, que l'altération est due à une transformation partielle de l'axérophtol en rétinal.

Etude de la stabilité des solutions diluées d'Axérophtol

La constatation précédente nous a conduit à étudier, en solution pure, les modifications spectrales des solutions dans l'éther de pétrole très diluées d'axérophtol à 10 μg par ml dans diverses conditions . La solution placée en flacon de verre incolore, a été conservée pendant dix jours :

1) - à la lumière et à la température ambiante (+20°)
2) - à l'obscurité et à la température ambiante
3) - à l'obscurité et au froid (+ 4°C)
4) - à l'obscurité à la température ambiante, sous atmosphère d'azote.

Les résultats des mesures de la densité optique au maximum d'absorption sont reportés sur le graphique ci-après. On peut en conclure que :

- l'influence de la température est négligeable (courbes II et III pratiquement superposées)
- le stockage sous azote et à l'obscurité assure une stabilité suffisante.

Ces constatations dictaient dès lors les conditions à respecter pour éviter une destruction de l'Axérophtol en cours de chromatographie. Ces conditions ont été obtenues
- en effectuant le dépôt rapidement, en lumière atténuée,
- en effectuant la chromatographie sous azote et à l'obscurité.

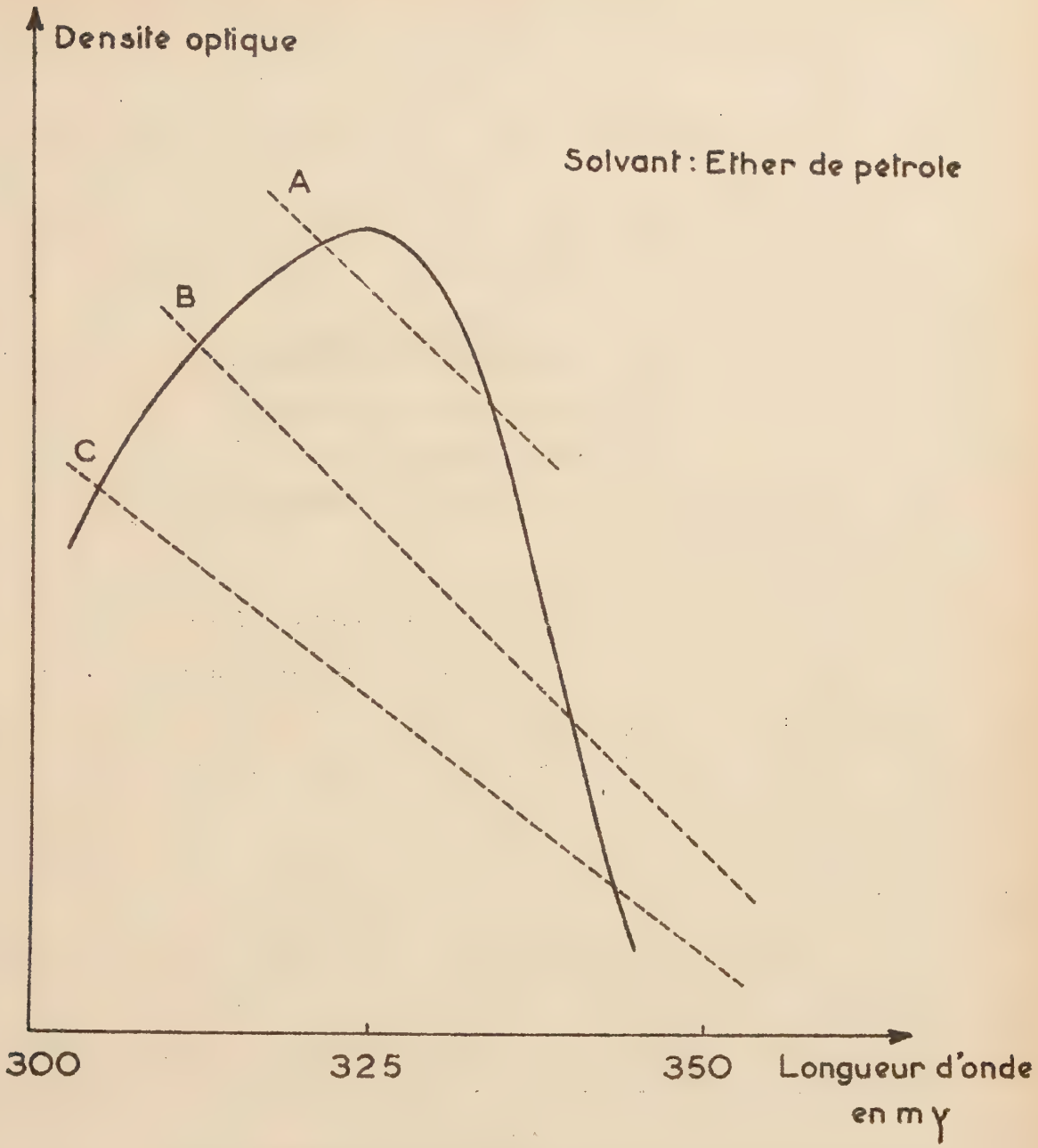
Pratiquement, après fermeture de la cuve l'atmosphère de celle-ci est purgée d'air par un courant d'azote. Le couvercle de la cuve est percé de deux orifices. Ces deux orifices étant ouverts, on introduit par l'un deux une canule de verre reliée à une bouteille d'azote munie d'un manomètre à double détente, on laisse l'azote se dégager pendant trois minutes. Les deux orifices sont fermés au moyen d'un bouchon en caoutchouc, la cuve est alors entièrement recouverte d'une enveloppe de papier noir.

Résultats de la chromatographie sous azote à l'obscurité

Le contrôle spectrométrique de la solution éluée montre un tracé pratiquement superposable à celui de la solution de départ.
- la construction de VACHER- MORTON/STUBB ne montre pas d'altération,
- les résultats quantitatifs sont donnés par les tableaux V et VI

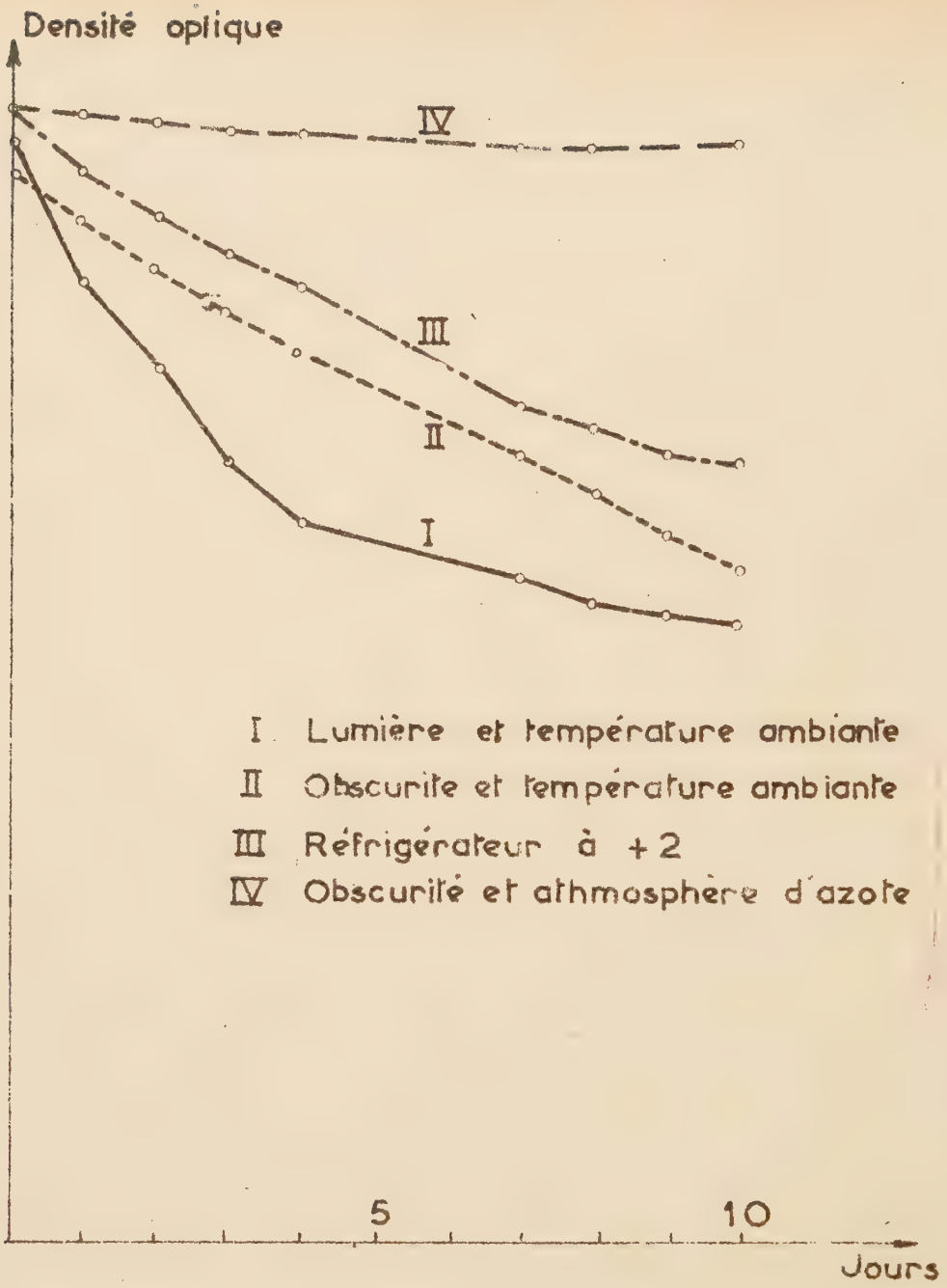
Tableau V récupération de l'Axérophtol après chromatographie et élution :

1) - Axérophtol pur



SPECTRE D'ABSORPTION de L'AXEROPHTOL

après migration sur papier aluminé



ALTERATIONS DES SOLUTIONS DILUEES D'AXEROPHTOL DANS L'ETHANOL

		Quantité déposée en µg	Quantité retrouvée en µg	Erreur relative
Essai	A	12,76	12,90	+ 1,8 %
	B	6,62	6,60	- 0,3 %
	C	19,34	19,50	+ 0,9 %

TABLEAU V

Tableau V. - Récupération de l'Axérophtol après chromatographie et élution

2) - Axérophtol en présence de quantités croissantes de calciférol

Vitamine A en µg déposée	Vitamine A en µg retrouvée	Vitamine D en µg déposée	Rapport moléculaire A/D	Erreur relative
13,84	14,00	20	0,96	+ 1,1 %
15,90	16,20	20	1,01	+ 1,9 %
12,93	12,90	20	0,30	- 0,2 %
10,03	9,80	40	0,25	+ 2,3 %
13,09	13,30	40	0,33	+ 1,6 %
7,94	7,70	60	0,18	- 3 %

TABLEAU VI

N.B. Lors des premiers dosages et dans le but d'accélérer les opérations nous ne maintenions pas assez longtemps dans la cuve le papier au contact des vapeurs de solvant avant la chromatographie. Le papier n'étant pas en état d'équilibre avec l'atmosphère de la cuve, il en résultait des erreurs qui semblaient augmenter avec la quantité de vitamine D déposée, comme le montre le tableau VII.

Vitamine A		VitamineD	Rapport moléculaire	Erreur relative
déposée	retrouvée	déposée		
10	9,75	0	-	- 2,5
10	9,25	20	0,66	- 7,5
10	9,5	40	0,33	- 5
10	8,5	80	0,16	- 15

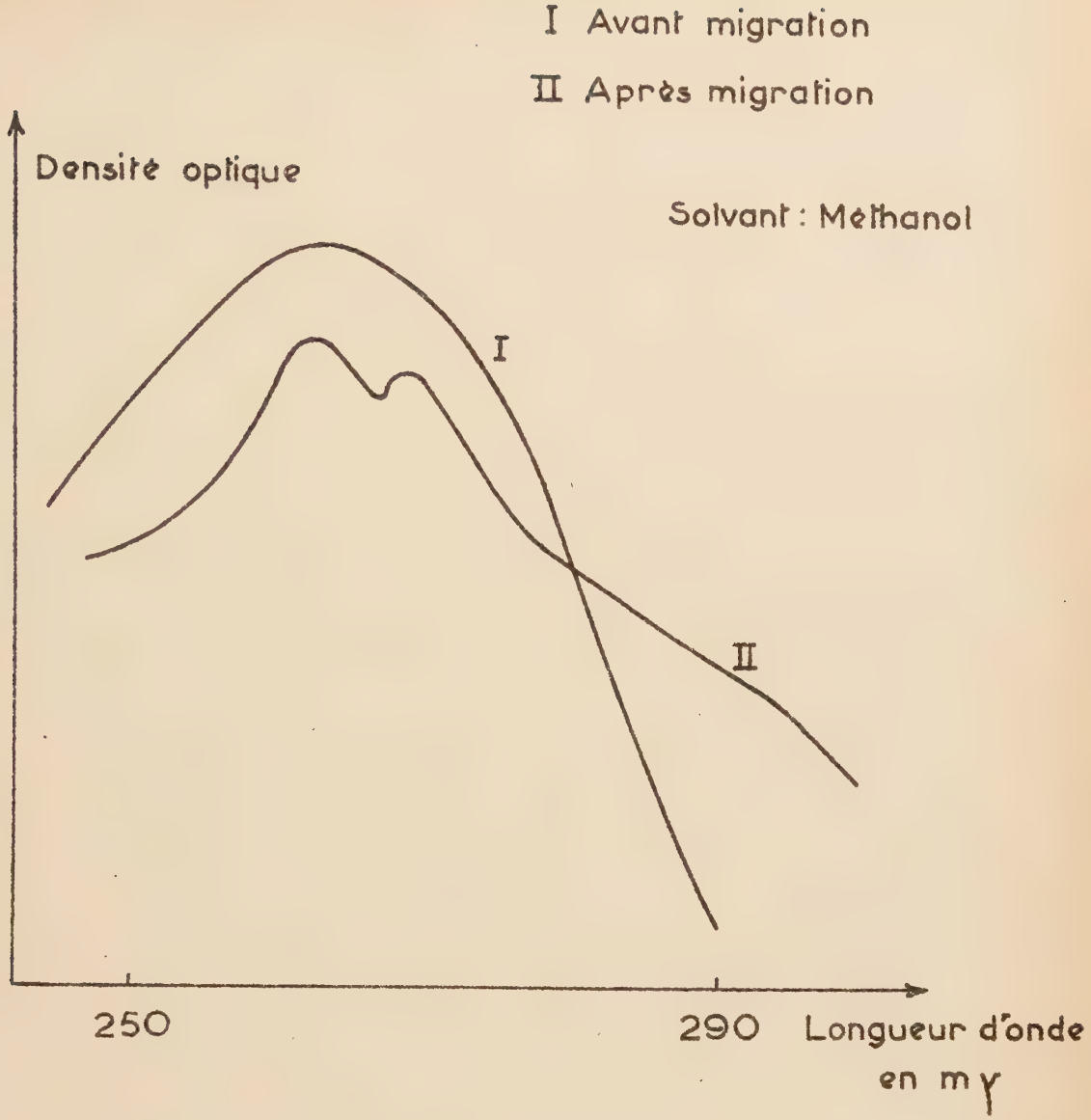
Tableau VII

Elution de la vitamine D

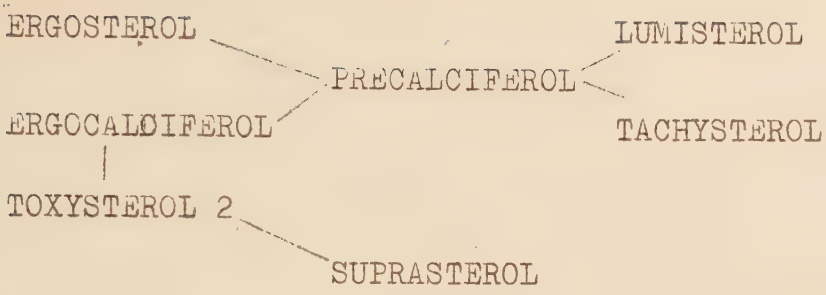
Le problème de la chromatographie quantitative de l'Axérophtol étant résolu, nous avons abordé le cas du calciférol. Disons sans attendre que tous nos essais furent des échecs.

1) Par analogie nous avons d'abord tenté de recueillir la vitamine D en continuant le balaygge du papier par chromatographie descendante, après recueil de la fraction renfermant la vitamine A. Mais, pour déplacer la vitamine D des quelques 20 cm qui la séparent de la vitamine A, il nous a fallu poursuivre l'opération pendant trois jours.

2) Nous avons alors procédé par élution simple de la portion de la bande contenant le calciférol, repéré sur une bande témoin au moyen de ses diverses réactions. L'élution a été pratiquée en plusieurs solvants : méthanol, éthanol, éther de pétrole. L'éluat analysé par spectrométrie contenait toujours des produits d'altération de la vitamine. C'est à ce moment que nous eûmes connaissance des conclusions de MAYER et Collaborateurs (65) qui se sont heurtés aux mêmes difficultés que nous rencontrions nous-même. Ces auteurs admettent pour expliquer leur échec, des modifications pouvant se produire par des mécanismes différents selon le schéma indiqué par VELLUZ (117) :



Comparaison des spectres d'absorption
du calciférol avant et après migration sur papier aluminé



Mais le travail de MAYER et Collaborateurs permet aussi de suspecter l'élution elle-même. Sur le support aluminé en effet, une partie des vitamines et de leurs éventuels produitsd'altération demeure fixée. L'emploi de substances marquées au C 14 prouve un déficit de l'élution. L'alumine se comportant vraisemblablement à la fois, comme un support actif susceptible d'entrainer des modifications structurales, et comme un adsorbant capable de retenir énergiquement le corps fixé. Sans vouloir discuter plus avant ces hypothèses il nous faut retenir - et ce sera la conclusion de ce chapitre - que si le papier aluminé permet, sous certaines conditions , d'effectuer la séparation chromatographique correcte de la vitamine A et son dosage ultérieur, il ne permet pas de résoudre le problème du dosage simultané de l'Axérophtol et du Calciférol.

Chapitre VII

Chromatographie sur papier au stéaro-chlorure de chrome ("Quilon")

Le chapitre précédent fait état d'une réussite partielle, mais capitale. Pour la première fois, semble-t-il, nous avions réuni les conditions nécessaires et suffisantes pour effectuer une chromatographie quantitative de l'Axérophtol. Par contre, dans ces mêmes conditions favorables au dosage de l'Axérophtol, le support aluminé ne permet pas l'isolement ni le dosage du Calciférol.

C'est alors que, reprenant l'étude des divers supports chromatographiques, nous avons eu l'idée de nous adresser à celui conseillé par Mc MAHON et Collaborateurs (63) pour la séparation des stérols et des vitamines D. Respectant les conditions définies au chapitre précédent, pour éviter la photolyse et l'oxydation de l'Axérophtol, il nous paraissait logique d'espérer qu'un support imprégné de stéaro-chlorure de chrome permettrait à la fois la séparation des deux vitamines et leur élution sans perte ni altération, en vue d'un dosage spectrométrique ultérieur.

Le Stéaro-chlorure de chrome, plus connu sous le nom de "QUILON" est un complexe du type WERNER, fabriqué par la firme du Pont de Nemours à l'échelle industrielle , pour hydrofuger les fibres textiles les plus diverses (laine, coton, fibres synthétiques, feutres etc...) (1)

---

(1) Nous nous sommes procuré le "Quilon" auprès de la firme TOUZART & MATIGNON, 3, rue AMYOT, PARIS V°

Ce corps est livré sous la forme d'une solution isopropanolique à 30 p.100, de couleur vert foncé, dont le pH est de 2,5 à 3. Les solutions ne semblent pas s'altérer rapidement . Le spectre de l'échantillon qui nous a été remis présentait dans le visible un maximum à 420mμ, un autre à 590 mμ. La solution peut être diluée dans l'eau mais le produit dilué n'est plus stable, le stéaro-chlorure de chrome s'hydrolysant en solution aqueuse.

(formule : voir page suivante)

o

• •

La molécule du stéaro-chlorure de chrome présente une extrémité polaire, une autre non polaire; déposée à la surface d'une fibre capable de capter les ions polaires, elle s'oriente. Si l'on chauffe alors au dessus de +100°C, il se produit une déshydratation avec apparition de ponts oxygène entre les atomes de chrome; le produit devient insoluble dans l'eau et la surface traitée est ainsi rendue imperméable.

Le succès commercial de ce corps a suscité la recherche de substances analogues dans la série des complexes du chrome. Les modifications ont surtout porté sur le remplacement du radical stéarique (par un radical gluconique par exemple). Aucun avantage majeur ne caractérise ces produits dérivés.

Préparation du papier au stéaro-chlorure de chrome

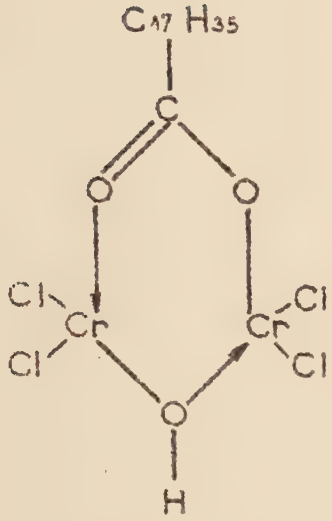
Le papier utilisé dans cette partie de notre travail est un "Whatman n°1" qui nous a donné toute satisfaction. L'imprégnation est faite en partant d'une solution à 2p.100 de "Quilon" obtenue en diluant 15 fois la solution mère dans l'eau distillée.

Les bandes de papier Whatman de 5 cm de large et de 25 cmde long ou les feuilles entières, sont immergées pendant deux minutes, puis essorées entre des doubles de papier filtre; elles présentent alors la couleur verte de la solution. La polymérisation exige une température de +100°C ± 2°; nous l'avons faite dans une étuve à dessication dans laquelle les feuilles ont été maintenues au moins 15 mn . Il n'est pas nécessaire d'augmenter la durée de séjour à l'étuve, encore que les propriétés du papier imprégné au Quilon demeurent identiques même si les feuilles sont chauffées pendant 24 heures. Par contre, la température doit être très exactement contrôlée.Au dessous de +95°C la polymérisation est incomplète, et lors de la chromatographie les solvants entraînent une partie de la substance. Au dessus de 102-105° le papier roussit, devient cassant; il est alors impropre à la chromatographie.

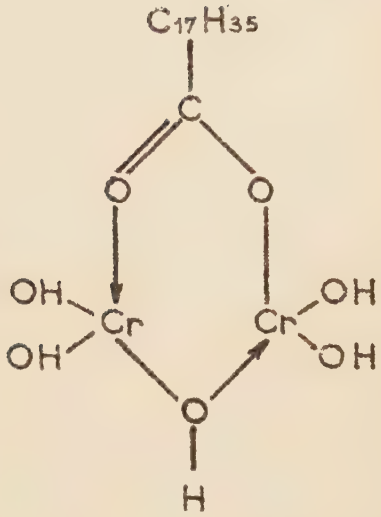
Au sortir de l'étuve les feuilles sont presque blanches, avec quelques reflets vert-pâle. Elles peuvent être stockées à plat pendant plusieurs mois sans modifications de leurs propriétés. En bref, la préparation est plus simple que celle des papiers aluminés, la conservation aussi bonne.

Chromatographie

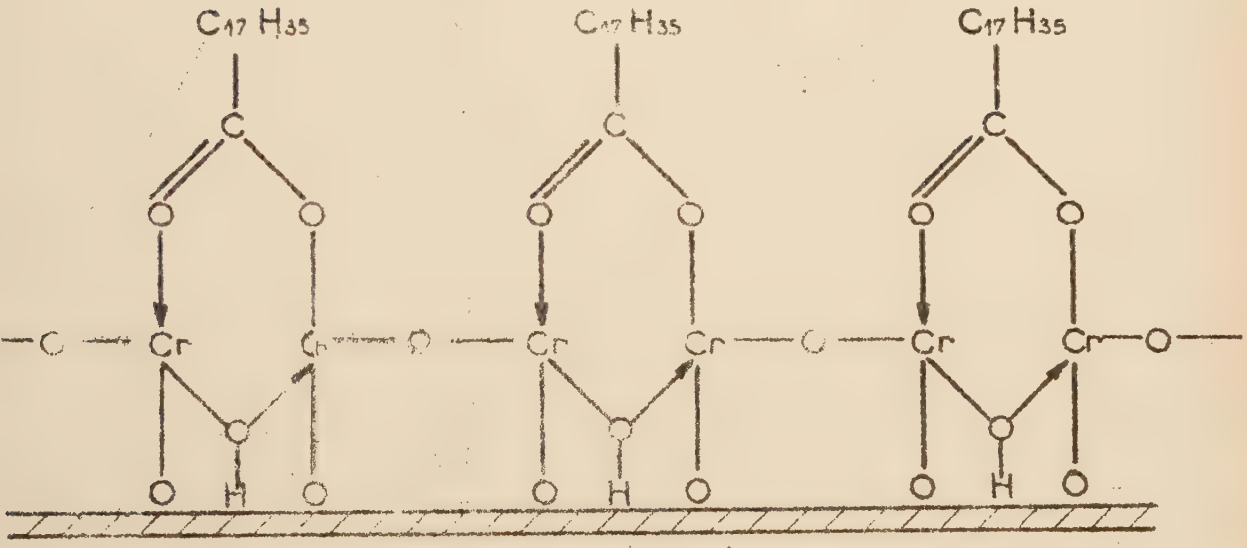
Elle est pratiquée par voie descendante, tous les autres détails opératoires étant identiquement ceux qui ont été décrits dans le cas du papier aluminé. On peut, indifféremment chromatographier sur bande ou sur feuille (ce qui est avantageux pour effectuer simultanément l'examen de plusieurs échantillons tout en constituant des témoins de vitamines pures). 10 à 20 γg de substance, en solution dans l'éthanol , sont suffisants. La durée de la chromatographie est réduite : deux heures seulement. Mais il y a



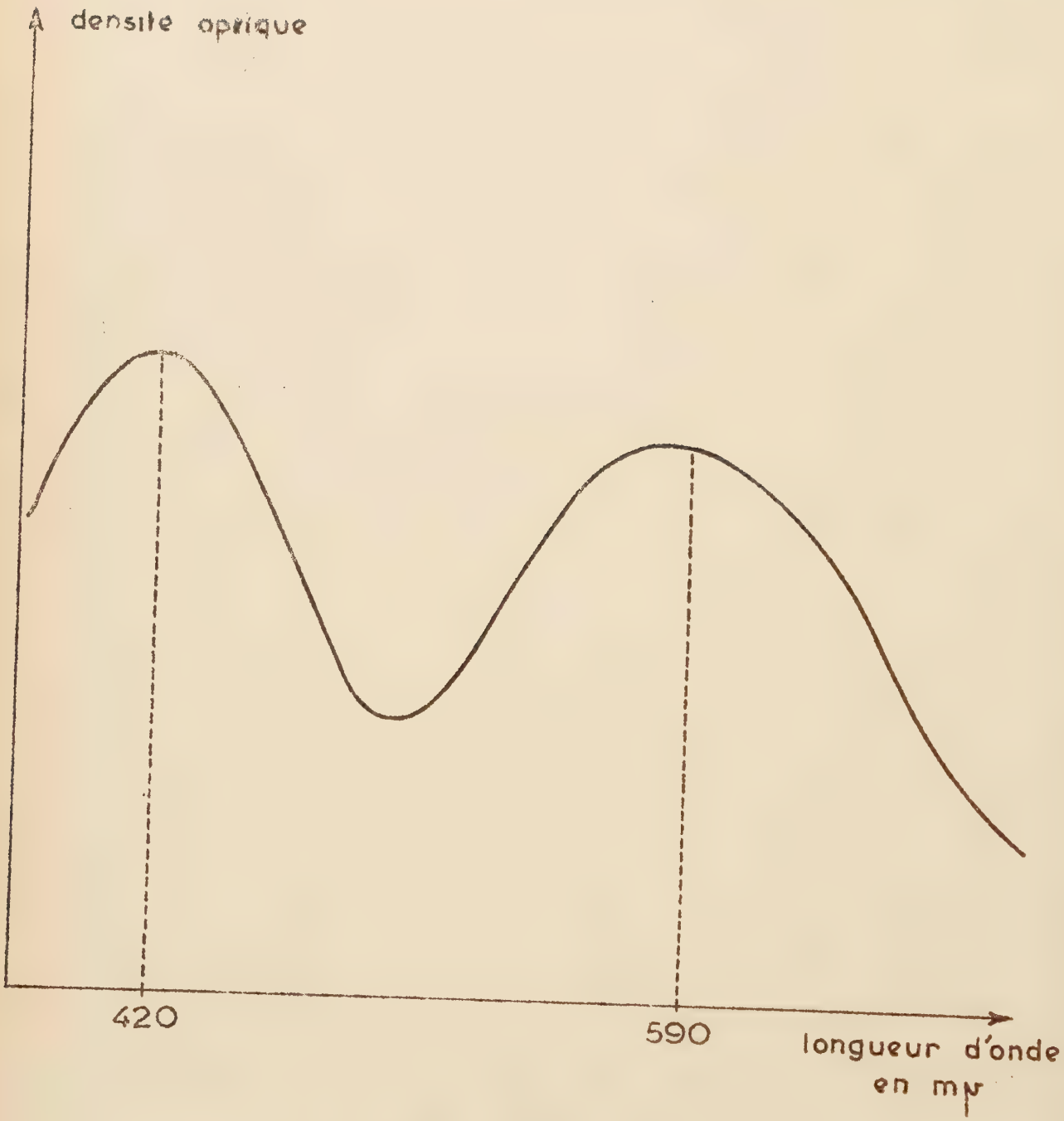
QUILON



QUILON en solution aqueuse



QUILON condensé



Spectre de Quilon

Dilution au 1/100e dans l'eau

intérêt pour la régularité des dosages à laisser séjourner le papier dans la cuve, déjà garnie de solvants, pendant 12 heures avant de mettre en train les opérations. La nuit peut, sans perte supplémentaire de temps, être consacrée à cette préparation.

Selon le système solvant, la zone frontale migre de 15 à 20 cm. Comme la migration a lieu dans l'obscurité (cuve recouverte d'un papier noir) c'est le temps de migration qu'il faut contrôler et non la distance parcourue.

Solvants

Le tableau VIIIdonne la liste de ceux que nous avons expérimentés. Il apparaît que seuls les mélanges à base de méthanol donnent des résultats valables. D'une façon générale les solvants trop rapides donnent des traînées car il est vraisemblable que l'équilibre entre les deux phases n'a pas le temps de se produire. Dans tous les cas c'est l'axérophtol qui a le plus tendance à traîner. Si l'on veut éviter que l'axérophtol ne reste au point de départ (il vaut mieux n'y laisser que des caroténoïdes et les autres impuretés !) on doit, puisqu'il s'agit d'une chromatographie à phases inversées, diminuer la polarité de la phase mobile, afin d'augmenter le Rf de la vitamine A. On peut y parvenir de différentes façons, mais il faudra veiller à ce que la composition du solvant soit rigoureusement respectée, de très faibles variations des proportions entrainent en effet d'importantes modifications du Rf. Le tableau IX relatif aux mélanges méthanol/butanol/benzène/eau, donne une idée de ces modifications.

Etude des systèmes solvants utilisés pour la chromatographie sur papier imprégné au stéaro-chlorure de chrome (Quilon)

Nature ou composition du solvant .	Valeur du Rf	
	Vitamine A	Vitamine D
Ether de pétrole	1	1
Ether de pétrole saturé de propane diol	1	0,90
Cyclohexane	1	0,95
Acétone	1	0,95
Isopropyl ether	0,95	0,95
Butanol	0,95	0,95
Butanol-Eau	0,90	0,90
Ethanol	0,95	1
Ethanol-méthanol	0,80	0,90
Méthanol	0,50	0,75
Méthanol-Eau 10/0,5	0	0,90
Méthanol-Eau 10/1	0	0,55
Méthanol-Eau 10/2	0	0,30
Méthanol-Ether 10/0,25	0,55	0,80
Méthanol-Ether 10/0,5	0,60	0,75
Méthanol-Ether 10/1	0,60	0,70
Méthanol-Ether 10/1,5	0,65	0,70
Méthanol-Ether 10/3	0,80	0,85
Méthanol-Eau-Ether 10/1/0,25	0	0,50
Méthanol-Eau-Ether 10/0,5/0,5	0,2	0,75
Méthanol-Eau-Ether 10/1/1	0	0,70

T.S.V.P.

Méthanol-Eau-Ether 10/1/2	0,4	0,75
Méthanol-Eau-Ether 10/0,5/4	0,90	1
Méthanol-Eau-Ether 10/1/7	0,95	1
Méthanol-Eau-Ether 10/2/8	1	1
Méthanol-Eau-Ether 65/10/25	0,85	0,90
Méthanol-Eau-Ether 65/20/15	0	0,80
Ether-Eau 90/10	1	1
Ether-Eau 80/20	0,30	0,85
CH_3OH-Eau 95-5	0	0,90
CH_3OH-Eau-Cyclohexane 90-5-5	0	0,80
CH_3OH-Eau-Cyclohexane 90-5-10	0	0,64
CH_3OH-Eau 95-5 saturé de cyclohexane	0	0,45
Acétone	1	1
CH_3OH-Acétone 95-5	0 - 0,5	0,3 - 0,8
CH_3OH-Butanol 100-10	0 - 0,7	0,8
CH_3OH-Butanol 100/10	0 - 0,7	0,8
CH_3OH-Butanol-Eau 40/20/20	0	0,30

TABLEAU VIII

Variations du Rf de l'Axérophtol et du Calciférol en fonction de la composition du solvant.

Composition du système solvant				Valeurs du Rf	
CH_3OH	Eau	Butanol	Benzène	VitamineA	VitamineD
50	20	20	20	0	0,92
40	20	20	20	0	0,75
40	20	25	20	0,15	0,62
40	20	30	20	0,74	0,74
40	20	25	25	0,80	0,80
40	20	20	25	0,75	0,78
40	20	20	30	0,82	0,85
40	10	20	30	0,67	0,70
30	10	20	40	0,75	0,75
30	10	30	30	1	0,98

TABLEAU IX

En définitive nous recommandons les deux mélanges suivants qui donnent de très bonnes séparations avec spots réduits :

I. Méthanol/Butanol/Benzène/Eau (40/25/20/20)

II. Méthanol/Ether/Eau (75/15/10)

Il faut évidemment, lorsqu'on utilise le second solvant éviter soigneusement l'évaporation de l'éther.

Le tableau X , donne pour ces deux mélanges, les valeurs des Rf des différents corps examinés.

Valeurs des Rf des vitamines A et D et de certains corps voisins après chromatographie sur papier imprégné au stéarochlorure de chrome

Nature des solvants	I	II
Beta carotène	0	0
VitamineA alcool	0,34	0,18
VitamineA palmitate	0,20-0,25	0,20
VitamineA acétate		0,15
Retinal	0,82-0,90	0,85
Vitamine D2	0,80	0,60
Vitamine D3		0,62
Ergostérol	0,65	0,52
Cholestérol	0,70	0,48

Composition des systèmes solvants :

I) CH_3OH/Eau/Ether 75/10/15

II) CH_3OH/Eau/Butanol/Benzène 40/20/25/20

TABLEAU X

A noter que le rétinal nous a donné régulièrement deux spots voisins dans le cas du mélange méthanol/éther/eau. Notre échantillon pourtant était pur et conservé en ampoule scellée sous vide. Vraisemblablement il doit s'agir des deux formes isomériques de type trans et cis-trans du rétinal.

De toutes façons, on constate que la séparation est satisfaisante et que l'isolement des vitamines les unes des autres ainsi que leur séparation des produits voisins est possible.

Révélation

Nous avions d'abord adopté le classique réactif de CARR et PRICE, mais il nous a semblé que sur papier au "Quilon" la réaction se développait de façon moins satisfaisante que sur papier ordinaire surtout en ce qui concerne l'axérophtol. Nous avons alors retenu un réactif phosphomolyldique de composition suivante :

Acide phosphomolyldique	1 g
Alcool à 95	15 ml

Ce réactif a été décrit par KRITCHEVSKY et KIRK (55) pour l'étude des stéroïdes, mais ne semble pas avoir reçu d'applications dans le domaine des vitamines liposolubles. Nous en signalons la valeur, car il présente des avantages manifestes .

Le réactif est pulvérisé sur les bandes sèches, puis celles-ci sont soumises à un courant d'air chaud ou placées dans une étuve à 50° pendant quelques minutes. Il apparait alors une tache gris bleuté à l'endroit où se trouve l'Axérophtol, une tache gris-violacé à l'emplacement de la vitamine D, le fond du papier se colorant en jaune.

Après comparaison avec les diverses techniques nous ne saurions trop recommander ce réactif pour les raisons suivantes :

- sa préparation est simple est rapide. Il ne demande pas de produits spéciaux,
- sa conservation est aisée : utilisable pendant une semaine lorsqu'on le garde sans aucune précaution, il peut se conserver plus d'un mois au frais et à l'obscurité,
- sa sensibilité est très grande : des quantités inférieures à 1 µg donnent encore une réaction nette. De plus, la

sensibilité est comparable pour les divers produits à révéler,

-la coloration étant stable, il est possible de conserver les chromatogrammes plus d'un mois sans modification, ce qui permet d'en différer l'interprétation.

Le réactif n'a évidemment aucune spécificité mais dans le cadre de notre travail ceci est un avantage : nous pouvons en effet localiser tous les produits soumis à notre étude en une seule opération (Béta carotène, rétinal, vitamines, stérols,...)

Elution

Les échecs rencontrés lors de la récupération des vitamines chromatographiées sur papier paraffiné (voir page 61) nous ont permis de brûler les étapes :

1) dans un premier temps nous avons expérimenté sur des quantités connues de vitamines déposées sur des fragments de papier au "Quilon" de 5 x 2 cm. Aussitôt après séchage le papier est découpé en une dizaine de fragments plus petits qu'on introduit dans des flacons jaunes à large ouverture, de 50 ml environ, fermés par une capsule hermétique en polythène souple. L'extraction est faite au méthanol (10 à 20 ml) pour les raisons suivantes :

   a) le dosage spectrophotométrique est possible en solution dans le méthanol sans purification préalable,
   b) le pouvoir solvant du méthanol, lié à sa forte constante diélectrique, est un des plus élevé ainsi que l'on montré TRAPPE (111) et JACQUES et MATHIEU (45)ainsi que STRAIN (109). L'atmosphère du flacon est ensuite débarrassée d'oxygène par léger barbotage d'azote. Les flacons bouchés sont conservés à l'obscurité et agités toutes les 5 minutes pendant 30 minutes. Le dosage spectrométrique est effectué aussitôt après

à 328 mμ pour l'Axérophtol, à 265 mμ pour le Calciférol. Le tableau XI réunit les résultats obtenus, et montre que :

- le "blanc" d'élution a une absorption pratiquement nulle,
- l'absorption est proportionnelle aux quantités déposées,
- le rendement est voisin de 1.

Etude de l'élution par le méthanol (sans migration préalable) des vitamines déposées sur papier imprégné au stéaro-chlorure de chrome

1) Vitamine A. 2) Vitamine D2.

Vitamine A déposée en μg	Vitamine A retrouvée en μg	Erreur %
5	5	0
10	9,5	-5
20	20,4	+2
30	29,2	-2,6
50	48,6	-0,8
75	72	-4,1
100	94	-6

TABLEAU XI

Vitamine D déposée en μg	Vitamine D retrouvée en μg	Erreur %
5	4,6	-8
10	10,6	+6
20	12,5	-37,5 ?
30	29,5	-1,6
50	49	-2
75	73,5	-2
100	95,5	-4,5

TABLEAU XII

2) Dans une seconde expérience nous avons opéré de même en découpant, après chromatographie les régions où nous savions que se trouvaient les deux vitamines. Pour avoir un bon repérage nous avons préféré révéler une chromatographie faite dans les mêmes conditions plutôt que de nous fier uniquement au Rf dont la valeur peut varier légèrement d'une opération à l'autre.

Si les opérations sont menées rapidement les résultats sont satisfaisants et le rendement compris entre 95 et 100 p. 100.

3) Enfin le mode opératoire adopté a été appliqué à des mélanges de deux vitamines en proportions variables, le dosage proprement dit étant toujours fait par spectrométrie de l'éluat. Les résultats de ces contrôles sont donnés au tableau XIII ; ils montrent que pour des quantités d'Axérophtol et de Calciférol allant de 5 à 100 µg - même si le rapport vitamine A/vitamine D varie dans la proportion de 1 à 20 le dosage peut se faire avec une précision de ± 5%. Le mode opératoire donné en annexe fixe les détails de la chromatographie et du dosage proprement dit.

Dosage spectrométrique de l'Axérophtol et du Calciférol en mélange, après séparation chromatographique sur papier imprégné de stéaro-chlorure de chrome.

Essai n°	Rapport moléculaire. V.A/V.D	Vitamine A en µg introduite	Vitamine A en µg retrouvée	Vitamine A Erreur %	Vitamine D en µg introduite	Vitamine D en µg retrouvée	Vitamine D Erreur %
1	0,067	5	5	0	100	95,6	4,84
2	0,33	5	5,2	4	20	19	5
3	0,33	10	10,4	4	40	40	0
4	1,35	10	10,6	6	10	9,4	6
5	1,35	100	96,5	3,5	100	97,4	2,5
6	6,75	50	47,8	4,8	5	5	0
7	13,5	50	51	2	5	5,8	16?
8	27	100	98	2	5	4,8	4

TABLEAU XIII

TECHNIQUE OPERATOIRE

Matériel

- Papier au stéaro-chlorure de chrome en bandes de 5 x 50 cm (voir préparation page 81.
- Micropipettes de précision ou tubes capillaires tarés
- capuchon de papier noir.
- Flacons de 30 à 50 ml en verre coloré, bouchant hermétiquement au moyen d'un bouchon de polythène.
- Spectrophotomètre.
- Obus d'azote muni d'un double détendeur permettant d'obtenir un courant d'azote sous une pression de quelques centaines de grammes seulement.

Réactifs

- Solutions témoins préparées extemporanément et maintenues à la glacière et à l'obscurité, de vitamine A et vitamine D à 2.000 µg/ml dans l'éthanol (titre 99°)
- Phase mobile :

a) Méthanol 40
Eau 20
Butanol 25
Benzène 20

b) Méthanol 75
Eau 10
Ether 15 préparée avec des solvants convenablement purifiés par distillation.

- Méthanol pur (de préférence bidistillé).

Dépôt

- Sur une ligne de départ tracée à 12 cm du bord de la feuille, déposer la solution à analyser (solution dans l'éthanol) de façon que les quantités des

deux vitamines déposées soient comprises entre 5 et 100 µg sous un volume de 0,01 à 0,1 ml.

- Le dépôt doit se faire le plus rapidement possible, dans un endroit peu éclairé, et en provoquant au fur et à mesure une évaporation au moyen d'un léger courant d'azote.
- Réaliser le dépôt en promenant la pipette sur la ligne de départ sur une largeur de 3 cm (dépôt en hauteur aussi faible que possible).
- Placer les deux bandes pendant 12 heures au moins dans la cuve, au fond de laquelle on aura disposé le solvant, un cylindre de papier filtre plongeant dans ce dernier et assurant une saturation rapide de l'atmosphère. Purger d'air et recouvrir la cuve de papier noir.

N.B. Préparer et traiter simultanément une bande témoin avec les solutions références de vitamines en mélange .

Migration

Après ce laps de temps, introduire rapidement la phase mobile. Faire passer un courant d'azote pendant quelques minutes. Laisser migrer deux heures. Retirer la bande témoin et révéler les vitamines par pulvérisation de réactif phosphomolybdique.

Elution

Découper sur la bande servant au dosage la zone correspondant à chacune des vitamines. Fragmenter la zone ainsi découpée en une dizaine de fragments et introduire ces derniers dans des flacons contenant 10 ou 20 ml de méthanol. Faire passer un léger courant d'azote et obturer. Agiter toutes les cinq minutes pendant 30 minutes.

-Préparer de même un essai à "blanc" en faisant subir le même traitement à un fragment de la bande prélevé en un point

ne contenant pas de substances révélables au réactif phosphomolybdique.

Mesure

- Transvaser la solution dans l'éthanol à doser dans une cuve en quartz du spectrophotomètre et effectuer les mesures dans l'Ultra violet :
  - à 328 mμ pour l'axérophtol,
  - à 265 mμ pour les vitamines D.
- Tenir compte éventuellement de l'absorption de l'essai à "blanc".
- Se reporter aux droites d'étalonnage pour calculer la quantité de vitamine, d'après la densité optique mesurée.

RESUME et CONCLUSION

A) Résumé

1) Nous relatons dans ce travail les tentatives faites pour séparer par chromatographie et doser par spectrométrie ultraviolette les mélanges d'Axérophtol et de Calciférol.

2) Dans une première partie, les travaux antérieurs ont été examinés de façon critique, ce qui nous a permis de passer en revue les propriétés physicochimiques et les réactions différentielles utilisables dans le but proposé.

3) La seconde partie fait état de nos recherches personnelles. Sont examinées successivement :

- la spectrométrie des mélange d'Axérophtol et de calciférol,
- la chromatographie sur cellulose imprégnée
  - de paraffine
  - d'alumine
  - de stéaro-chlorure de chrome ("Quilon")

4) On a défini les conditions expérimentales qui permettent d'éviter la photolyse ou l'oxydation des deux vitamines, étudié la séparation par chromatographie au moyen de mélanges solvants convenables ainsi que les conditions d'élution quantitative des vitamines.

5) Un mode opératoire détaillé apporte une solution pratique au problème proposé dans le cas de solutions pures des deux vitamines.

B) Conclusion

La séparation chromatographique de l'axérophtol et du calciférol sur papier imprégné au stéaro-chlorure de chrome ("Quilon"), en atmosphère d'azote et à l'obscurité suivie d'une élution par l'éthanol et d'une spectrométrie de l'éluat permet de doser 5 à 100 microgrammes de vitamines en mélange, dans des proportions quelconques, avec une précision de $\pm$ 5 %. La durée des opérations est de trois heures environ, elles peuvent être conduites en série.

Au moment de terminer notre travail, nous avons eu connaissance d'un important travail de RAOUL et collaborateurs (90 bis) mettant en évidence une différence notable d'action entre la vitamine D3 naturelle et les vitamines synthétiques.

En effet, les auteurs constatent que les vitamines D2 et E3 synthétiques sont, suivant les lots de fabrication, tantôt hypercalcémiantes, tantôt hypocalcémiantes dans les tests employés et notamment dans des conditions d'utilisation thérapeutique.

Ceci nous montre combien les interprétations d'action biologique sont délicates dans le cadre des vitamines et combien est souhaitable un dosage physico-chimique qui permettrait d'évaluer avec assez de précision chacune des molécules à doser.

B I B L I O G R A P H I E

1 - AMES (S.R.), HARRIS (P.L.) - Identification of the so-called "laid-factor" as the vitamin A. Science 1954, 120, 391-3.

2 - BAGNALL (H.H.), STOCK (F.G.) - A critical account of the spectromphotometric estimation of vitamin A. J. Pharm. Pharmacol. 1952, 4/2, 81-94.

3 - BLANCO SANTIAGO (E.), MIRANDA GONZALEZ-MONTES (L.) - La correction de Morton-Stubbs dans le dosage des concentrés de vitamine A. Influence de la distillation moléculaire sur la forme de la courbe d'absorption des concentrés vitaminiques. Ion, Madrid, 1952, 12, n°135, oct. 523-526.

4 - BOCCACCI (M.) - Determination della vitamina D presenza di vitamina A mediante cromato su carta. Rend. Ist. Sup. di Sanita 1958, 21 (3).

5 - BROCKMANN (H.), CHEN (W.) - Die Isolierung des antirachitischen vitamins aus Thumfischleberöl. Z. Physiol. Chem. 1936, 241, 104-15.

6 - BROWN (J.A.) - Dosage des vitamines A et E par chromatographie sur papier. Analyst. Chemistry 1953, 25,n°5, 774-7.

7 - BUDOWSKI (P.), BONDI (A.) - Determination of vitamin A by couvertion to anhydrovitamin A. Analyst. 1957, 82, 751-60.

8 - CALDWELL (M.J.), PARRISH (DB.) - Effet de la lumière sur la stabilité de la détermination colorimètrique par la réaction de CARR et PRICE. J. Biol. Chem. 1945, 158, 181-6.

9 - CALDWELL (M.J.), HUGHES (J.S.) - Effet de la température sur la diminution de la couleur de la vitamine A et des caroténoïdes dans la réaction de CARR et PRICE. J. Biol. Chem. 1947, 170, 97-103.

10 - CARR et PRICE - Proposition of a colorimetric determination of vitamin A with SbCl3.
Biochem. J. 1926, 20, 497-501.

11 - CAVINA (G.) - Applicazione del reattivo tricloruro di antimonio all' 1% in cloroformia, al dosaggio della vitamina A.
Rend. Ist. Sup. Sanita. 1957, 20, 913-22.

12 - CHRISTENSEN (M.) - Eine chemische reaktion auf vitamine und hormone.
Munch. Worchschr. 1928, 75, 1883.

13 - Mc. COORD (A.B.) - Emploi du 1-2 dichloro éthane dans le réactif de CARR et PRICE au SbCl3 pour la détermination de la vitamine A.
J. Of. Lab. Chim. Med. (St Louis) 1953, 27, 42-4.

14 - CORBET (R.E.), GEISNGER (H.H.), HOLMES (H.N.) - Substances qui interfèrent avec le test au trichlorure d'antimoine.
J. Biol. Chem.1933, 100, 657-66.

15 - CRUZ-COKE (E.) - Sur une réaction chimique de la vitamine antirachitique.
Compt. Rend. Soc. Biol. 1930,105, 238-9.

16 - DATTA (S.), OVERELL (B.) - Chromatographie de la vitamine A sur papier imprégné d'alumine.
Nature, 164, 673 (1949).

17 - DAVIS (R.B.), Mc MAHON (J.M.), KALNITSKY (G.) - Separation of D vitamins from other sterols by paper chromatography and the quantitative determination of 7-dehydrocholestérol.
J. Amer. Chem. Soc. 1952, 74, n°16, 4483-84.

18 - DENK (K.) - A fluorimetric method for vitamin A assay.
Ind. J. M. Res. 1955, 43 (3), 391-5.

19 - DE WITT (JD), SULLIVAN (MX.) - Spectrophotometric procedure for quantitative estimation of vitamin D.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1946, 18, 117.

20 - DREVON (B.), DONIKIAN (R.) - Sur une nouvelle méthode pour l'étude des glucoprotéines séparées par electrophorèse sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, 1321-25.

21 - DREVON (B.), LAUR (J.) - Une nouvelle méthode d'analyse des colorants ajoutés aux denrées alimentaires au moyen des ammoniums quaternaires.
Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 1958, 2, 99-105.

22 - EDEN (E.) - Une microméthode pour séparer la vitamine A libre et estérifiée.
Biochem. J. 1950, 46, 259.

23 - EDISBURY (J.R.), GILLAM (A.E.) HEILBRON (I.M.), et MORTON (R.A.) -
Biochem. J. 1932, 26, 1164.

24 - EGGITT (R.), WARD (L.D.) - Estimation of vitamin E activity by paper chromatography.
J. Sci. Ford. Agrie. 1953, 4, 176.

25 - EMBREE (N.D.), AMES (J.R.), LEHMAN (R.N.), HARRIS (P.L.) Determination ofvitamin A.
Meth. Biochem.Anal. 1957, 4, 43-98.

26 - EMBREE (N.D.), HAWKS (O;) - U.S. Pat. appl. 653-948.

27 - EMBREE (ND.), SHANTZ (E.M.) - A possible new number of the vitamins A1 and A2 group.
J. Amer. chem. Soc. 1943, 65, 906-9.

28 - ERBE (S.) - Beitrag zur colorimetrischen bestimmung des vitamins A mit verschiedenen chlorhydrinen.
Z. Anal. Chem. 1958, 159, 327-32.

29 - EWING (D.T.), SCHLABACH (T.D.), POWELL (M.J.) et col. Spectrophotometric determination of vitamins D in presence of vitamin A.
Anal. Chem. 1954, 26, n°9, 1406-1409.

30 - EWING (D.T.), POWELL (M.J.), BROWN (R.A.), EMETT (A.D.) Determining vitamins D2 by two physical chemical methods.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1948, 20, 317-20.

31 - EWING (D.T.), KINGSLEY (G.U.), BROWN (R.A.), EMETT (AD.) Physical chemical method for determination of vitamins D in fish liver oils.
Ind. Eng. chem. Anal. 1943, 15, 301-5.

32 - FISCHER (R.B.), HOLMES (R.) - Quantitative paper partition chromatography.
Biochem. J. 1949, 44, LIV.

33 - FISHER (H.), KREKELS (A.), HOVELS (O.) - Vitamin D on paper, detection by U.V. photography. Klin. Wochschir. 1952, 30, 137.

34 - FISCHER (R.B.), PARSONS (D.S.), MORRISON (G.A.) - Quantitative paper chromatography. Nature 1948, 161, 764-5.

35 - FLESCH (P.) - A colorimetric method for determination of vitamin A and carotene by perchloric acid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953, 84, 148-9.

36 - FLOOD (F.) - Uber die herstellung und anorganisch - chromatographiche anwendung von ionenaustauschfähigem papier. Z. Anal. Chem. 1940, 120, 327-35.

37 - FUJITA (A.), AOYAMA (M.), - Colorimetric and fluorometric determination of vitamin A infish liver oils, chromatographic separation of vitamin A and non-vitamin A material in the unsaponifiable matter. J.Biochem. (Tokyo) 1953, 40/2 (157-168)

38 - FUJITA (A.) , NUMATA (M.) - Simple colorimetric determination of vitamin D by using superfiltrol chromatography.

J. Vitaminol. 1958, , 4, 299-309.

39 - GILLMAN (J.) NORTON (K.B.) RIVETT (DEA.) SUTTON (DA.) - The identification and determination of vitamin A and Beta carotene in an animal fat mixture. Biochem. J. 1956, 63, 459-60.

40 - GREEN (J.) - The reaction of vitamin D and related substance with iodine trichloride. Biochem. J. 1951, 49, 36-45.

41 - GREEN (J.) - Studies on the analysis of vitamin D - A note on the preparation of floridin earth for vitamin D chromatography. Biochem. H. 1951, 49, 59-64.

42 - HALDEN (W.), TZOLI (H.) - A colour reaction for the detection and determination of vitamin D. Nature 1936, 137, 909.

43 - HEINANEN (P.), MYTTY (V.) et Coll. - The chromatographic determination of vitamins in pharmaceutical preparations The paper chromatography of vitamin D.
Farm. Aikakauslehti.1958, 67, 148,61.

44 - HJARDE (W.) - Acta. Chem. Scand. 1950, 4, 628.

45 - JACQUES (J.), MATHIEU (J.P.) - Rôle de la constante diélectrique dans la chromatographie par élution fractionnée.
Bull. Soc. Chim. France, 1946, 13, 94-8.

46 - JAKOVLJEVIC (I.M.) - Une nouvelle méthode spectrométrique pour le dosage de la vitamine A.
I. Mesure de la coloration rouge.
Pharm. Weekblad. 1958, 93,(12).

47 - KAISER (E.), KAGAN (B.N.) - Separation of vitamin A alcohol and vitamin A esters by paper chromatography.
Arch. Biochem. and Biophys. 1956, 63, 118-21.

48 - KANZAWA (T.); MIMA (H.) - Le dosage chimique de la vitamine D. I. La réaction au trichlorure d'antimoine et la séparation des vitamines D et A. II. La séparation de la vitamine D à partir des stérols et le dosage de la vitamine D dans les huiles de foie de poisson.
Pharm. Bull. Tokio, 1953, 1, n°3.195-202

49 - KARRER (P.), JUCKER (E.) - Die konstitution des "574 chromogens" oder hepaxanthins aus lobertran.
Helv. Chim. Acta. 1945, 28, 717-22.

50 - KELLER (W.), WEISS (F.) - Dosage de la vitamine A dans l'huile de foie de morue.
Fresenius Z. analyst. chem . 1957, 154, (4), 241-5.

51 - KIMURA (W.), FUJITA (A.) - On the determination of plasma vitamin A using glycol dichlorhydrin.
J. Vitam. Osaka 1956, 2, 227-31.

52 - KODICECK (E.) - Detection of vitamin A on paper chromatography.
Analyst. 1947, 72, 385.

53 - KODICECK (E.), ASHBY (U.R.) - Paper chromatography vit. D and others sterols.
Biochem. J. 1954, 57, 12.

54 - KRITCHEVSKI (D.) , CALVIN (M.) - Paper chromatography of steroids.
J.Am. Chem. Soc. 1950, 72, 4330.

55 - KRITCHEVSKY (D.), KIRK (M.R.) - Chromatography of steroids on paper.
Arch. Biochem. Biophys. 1952, 35, 346.

56 - LAMBERT (M.T.) - Iodine ethylene dichloride reaction for the determination of vitamin D
Dissertation Abstr. 1957, 17, 29-30.

57 - LAMBERTSEN (G.), BRAECKKAN (O.R.) - Losses of vitamin A during chromatography.
Acta. Chem. Scand. 1958, 12, 360-1.

58 - LAUGHLAND (D.H.), PHILLIPS (W.J.) - Dosage des vitamines D2 et D3 en solution pure.
Analyst. Chem. 1956, 28, n°5, 817-819.

59 - LAUR (J.) - La réaction ammonium quaternaire-colorant.
Thèse de Pharmacie. LYON 1959.

60 - LEDERER (E.), TCHEN (P.) - Etude sur le dosage de la vitamine A dans les huiles de foie de poissons. Purification chromatographique de la vit. A estérifiée.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1944, 26, 1032.

61 - LEVINE (V.) RICHMAN (E.) - Réaction du trichlorure d'antimoine avec les composés contenant des hétérocycles pentagonaux.
J. Biol. Chem. 1933, 101, 373-90.

62 - LYNESS (W.I.), QUACKENBUSH (F.W.) - Nouvelle réaction colorée pour les vitamines D.
Analyst. Chemistry. 1955, 27, n°12,1978-80.

63 - Mc MAHAON (J.M.), DAVIS (R.B.), KALNITZKY (G.) - Separation on paper of vitamins D2 and D3 and 7 dehydrochloesterol.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 75, 799.

64 - MARIANI (A.), CAVINA (G.) - Determinazione di vitamina D2 in presenza di vitamina A in prodotti farmaceutici ad in concentrati naturali.
Rend. Ist. Sup. Sanita, 1955, 18, 232-37.

65 - MAYER (A.) et Coll. - Some paper chtomatographic studies on vitamin D.
Pharm. Acta.Helv. 1958, 33, 603-20.

66 - MEUNIER (P.) - Le dosage électrophotométrique des vitamines.
Jobin et Yvon. Paris. 1951.

67 - MEUNIER (P.), DULOU (R.), VINET (A.) - Sur les conditions de formation et la constitution de la vitamine A "cyclisée".
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 371.

68 - MEUNIER (P.), RAOUL (Y.) - Etude cinétique de la réaction de CARR et PRICE. Application à la recherche qualitative et quantitative.
Bull. Soc. Chim.Biol. 1938, 20, 861-77.

69 - MEUNIER (P.) , VINET (A.) - Chromatographie et mesomérie.
Masson et Cie PARIS, 1947,

70 - MOESEMAECKER (R.) - Nouvelle réaction colorée de l'ergostérol. Differenciation de l'ergostérol et de l'ergostérol irradié.
Compt. Rend. Acad. Sc. 1930, 190, 216-8.

71 - MORTON (R.A.), HEILBRON (I.M.) - The absorption spectrom. of vitamin A. Bioch. J.1928,22, 987-96.

72 - MORTON (R.A.), STUBBS (A.L.) - Photoelectric spectrophotometry applied to the analysis of mixtures and vitamin A oils.
Analyst. 1946, 71, 348-56.

73 - MUELLER (V.N.) - Adsorption spectra of steroids . Antimony trichloride reaction product.
J. Am. Cehm. Soc. 1949, 71, 924-29.

74 - MULDER (F.J.), ROBORGH (J.R.), DE MAN (TH.J.), KEUNINE (K.J.), MANEWALD (K.H.) - A chemical routine determination of vitamin D, correlation with the biological determination (Analysis of fat soluble vitamins 11)
Recueil des Trav. chim. des Pays-Bas, 1957, 76, n°8, 733-45.

75 - MULLER (P.B.) - Examen en fluorescence des vitamines A et D.
Helv. Chim. Acta. 1944, 27, 443.

76 - MULLER (P.B.) - Zur kolorimetrischen bestimmung von vitamin A, vitamin D und beta carotin under besonderer berüch-sichtigung des vitamin D. Helv. Chim. Acta. 1947, 30, 1172-90.

77 - MUREA (L.), BERCOVICI (M.) - The use of indigenous bentonite for purposes of analysis. Its application to the separation of vitamin D2 from vitamin A with the aid of column adsorption chromatography.
Lucrarile prezentate conf. natl. Bucharest. Romania. 1958, 203-9.

78 - MYOLAJEWICZ (R.) - Quantitative evaluation of spots on paper chromatograms light flux measurement through negative printed spots.
Analyst. Chem. 1957, 29, 1350-56.

79 - NIELD (C.), RUSSEL (W.), ZIMMERLI (A.) - The spectrophotometric determination of vitamin D2 and D3
J. Biol. Chem. 1940, 136, 73-9.

80 - NINNI et NINNI (L et M.) - Conditions of adsorption of vitamin A by anion exchange resin duoliteA2
Prakt. Akad. Athenou. 1954, 29, 452-62.

81 - NORRIS (E.R.), CHURCH (A.E.) - Influence de la concentration du réactif employé et stabilité de la substance chromogène à la lumière, dans la réaction au Sb Cl3.
J. Biol. Chem. 1930, 89, 421-35.

82 - NORRIS (ER.) , CHURCH (A.E.) - Réaction au SbCl3 : stabilité de la vitamine A et des substances chromogènes dans différentes dilutions d'huile
J. Biol. Chem. 1930, 89, 589-98.

83 - NUMATA (K.) - Simple colorimetric method for vitamin D determination using superfiltrol.
Vitamins (Kyoto) 1956, 11, 444-9.

84 - ONISHi (K.) - chromatographic method of separating and mesuring serum A ester, vit. A alcohol and carotène.
Naika Hôkan 1958, 5, 258-62.

85 - PANCRAZIO (G.) et Coll. - Nomograms for calculating and testing the Morton and Stubbs correction in the spectrophotometric assay of Vitamin A.
Analyst. 1958, 83, 579-84.

86 - PETRACEK (F.J.) , ZECHMEISTER (L.) - The hydrolytic cleavage products of boron trifluoride complexes of beta carotène, some dehydrogenated carotènes and anhydrovitamin A1.
J. Amer. Shem. Soc. 1956, 78, 3188.

87 - PIRLOT (G.) - Anal. Chim. Acta. 1948, 2, 744.

88 - PRADHAN (S.K.), MAGAR (NG.), - Vitamins A1,A2 and neovitamin A in shark-liver oils.
Indian J. Med. Research. 1956, 44, 11-20.

89 - RAOUL (Y.) - Communication privée.

90 - RAOUL (Y.) - Dosage des vitamines liposolubles. Cas particuliers des vitamines D.
Prod. Pharm. 1957, 12, 167-174.

90 bis RAOUL (Y.), MARNAY (C.) LE BOULCH (N), GUERILLOT-VINET (A.) GOUNELLE (H.) - Existence de vitamines D hypercalcémiantes et hypocalcémiantes.
Annals. Pharm. F. 1959, 27, 481-90.

91 - RINDI (G.) - Une nouvelle méthode de séparation chromatographique de la vitamine A alcool, de son acétate et de son palmitate.
Internat. Zeits. für. Vitamin furschung 1957, 28, 1-2.

92 - ROBINSON (F.A.) - A new colour test for calciferol (vit. D2) and vit. D3.
Chem. and Ind. 1937, 56, 191.

93 - ROGERS (A.R.) - Spectrophotometric determination of vitamin D in pharmaceutical-II tablets of calciferol B.P.
J. Pharm. and Pharmacol. 1955, 7, 731-8.

94 - ROSENHEIM et DRUMOND. - Essai de dosage de la vit. A par une réaction colorimétrique à l'aide du $SbCl_3$.
Biochem. J. 1925, 19, 753-6.

95 - ROSENTHAL (E.), ERDELYI (J.) - Eine neue reaktion zum nachweis und zur kolorimetrischen bestimmung des vitamins A.
Bioch. Zeits. 1933, 267, 119-23.

96 - ROSSI (C.A.) - Chromatographie sur papier de la vitamine D2
Boll. Soc. Ital. biol. sper. 1950, 26, 1563.

97 - ROUIR (E.V.), PIRLOT (G.) - Dosage colorimétrique de la vitamine D2 dans les spécialités pharmaceutiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 1005-7.

98 - ROUIR (E.V.) - Essai de dosage simultané des vit.A et D.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, 234-8.

99 - SABOV (V.A.) - Chemical reactions for vitamin A
Laboratoire Delo. 1955, 6, 11-12.

100 - SADOK (M.) - Etude qualitative et quantitative de la chromatographie sur papier de l'ion mercurique.
Thèse de Pharmacie. Lyon, 1957.

101- SCHMALL (M.), SENKOWSKI (B.), COLARUSSO (R.), WOLLISH(E.G.) SHAFER (E.G.) - A photometric determination of vitamin D in presence of vitamin A.
J.A.P.A. 1958, 47, 239-44.

102 - SCHULTZ (H.D.), METHKE (A.) - Nouveau procédé pour l'interprétation de chromatogrammes et de bandes à l'électrophorèse.
Chem. Ing. Technik. 1955, 27, 214-5.

103 - SCHULTZ (H.D.), STRAUSS (D.) - Détermination quantitative d'alcaloïdes par chromatographie sur papier par mesure de la surface des taches.
Deutsche Apoth. Z. 1955, 95, 642-4.

104 - SHANTZ (E.M.), CAWLEY (J.D.), EMBREE (N.D.) - Anhydro ("cylised") vitamin A.
J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 901.

105- SHAW (WHC), JEFFREIES (IP), HOLT (T.E.) - Détermination de la vitamine D et des corps voisins.
Analyst. 1957, 82, 2-18.

106 - SHEAR (M.J.) - Colorimetric reaction of vit. D.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1925, 23, 546.

107 - SOBEL (A.E.), MAYER (A.N.), KRAMER (P.) - New colorimetric reaction of vitamins D2 and D3 and their vitamins.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1945, 17, 160-5.

108 - STOLTANER (W.) - Eine chemische reaktion auf antirachitisches vitamin.
Munch. Med. Wochschr. 1928, 75, 1584.

109 - STRAIN (H.H.) - Chromatographie adsorption analysis.
Inter sc. Publ. New-York. 1942.

110 - THIBAUDET (G.) - Transformation du calciférol en tachystérol par lesterres acides.
C.R.Ac.Sc. 1945, 220, 751.

111 - TRAPPE (W.) - Die trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren naturlichen bemischen durch Anwendung von adsorptionssäulen.
Biochem. Z. 1940, 305, 150-61.

112- TSCHAPKE (V.), PLESSING (H.) - Chromatographische trennug der vitamine A and D rit hilfe von bolus alba als quantitative schnel methode.
1957, Die Pharmazie, 5, 262-264.

113 - TSCHAPKE (H.), PLESSING (H.) - Séparation par chromatographie des vitamines A et D à l'aide du silicate d'alumine comme méthode quantitative rapide.
Pharmazie, 1957, 12, 262-4.

114 - TSCHAPKE (H.), PLESSING (H.) - Nouvelle séparation chromatographique des vitamines A et D.
Inter Z. Vitaminforsch. 1958, 28, 398-402.

115 - VACHER (M.) - Analyse graphique spectres contenant git. A .
Bull. Scc. Chim. Biol. 1949, n°34, 31, 675-83.

116 - VACHER (M.), LORTIE (Y.) - Dosage spectrophotométrique du calciférol en milieu organique complexe.
C.R. Ac. Sc. 1943, 216, 781-2.

117 - VELLUZ (L.), AMIARD (G.), GOFFINET (B.) - Le précalciferol . structure et photochimie. Son rôle dans la genèse du calciférol et des photoisomères de l'ergostérol.
Bull. Soc. Chim. Fr. 1955, 10, 1341 - 8.

118 - VENDT (V.P.) - Methods for the determinations of fat soluble vitamins A, D2,D3 and E.
Vitaminy, Akad. Nauk Ukr. SSR 1953, 7-29.

119 - VIGNAU (M.) - Sur la méthode de correction de Morton et Stubbs appliquée au dosage spectrographique de l'axérophtol.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 868-75.

120 - WHITE HOUSE (M.), BRESLER (A.), STAPEE (E.) - The use of iodine for the detection of lipids. J. of Chromatography. 1958, 1, 385-6.

121 - WILKIE (J.B.), JONES (S.W.), KLINE (O.L.), - Determination of vitamin D by a chemical method involving chromatography and color inhibition. J.A.P.A. 1958, 47, 385-94.

122 - WISS (O.), GLOOR (U.) - Verteilumgschromatographie mit umgehehrten Phäsen fur vitamin A und weitere fettloschidhe vitaminen. Hoppe. Seyler. Zschr. 1958, 310, 260-4.

123 - WISS (O.), GLOOR (U.) - Communication privée citée par SCHMALL (101).